

**POTENSI METABOLIT BAKTERI RIZOSFER TANAMAN  
KUMIS KUCING (*Orthosiphon stamineus*) SEBAGAI  
ANTIBAKTERI *Escherichia coli* 2056-U  
PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

oleh  
**VANIA ANDONA**  
**145090100111010**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**POTENSI METABOLIT BAKTERI RIZOSFER TANAMAN  
KUMIS KUCING (*Orthosiphon stamineus*) SEBAGAI  
ANTIBAKTERI *Escherichia coli* 2056-U  
PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

oleh  
**VANIA ANDONA**  
**145090100111010**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

# HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

## POTENSI METABOLIT BAKTERI RIZOSFER TANAMAN KUMIS KUCING (*Orthosiphon stamineus*) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Escherichia coli* 2056-U PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH

**VANIA ANDONA**  
**145090100111010**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada 17 Oktober 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui  
Pembimbing

Dr. Suharjono, M.Si.  
NIP. 196302231988021001

Mengetahui

Ketua Program Studi S-1 Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azharingsih, S.Si., M.Sc., PhD.  
NIP. 197001281994122001

## HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vania Andona  
NIM : 145090100111010  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi berjudul : Potensi Metabolit Bakteri Rizosfer  
Tanaman Kumis Kucing  
(*Orthosiphon stamineus*) sebagai  
Antibakteri *Escherichia coli* 2056-U  
Penyebab Infeksi Saluran Kemih

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 Oktober 2018

Yang menyatakan



Vania Andona  
145090100111010

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**Potensi Metabolit Bakteri Rizosfer Tanaman Kumis Kucing  
(*Orthosiphon stamineus*) sebagai Antibakteri *Escherichia coli*  
2056-U Penyebab Infeksi Saluran Kemih**

Vania Andona, Suharjono  
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya  
2018

**ABSTRAK**

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) digunakan untuk mengobati infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. Bakteri rizosfer *O. stamineus* mampu menghasilkan metabolit yang bersifat antibakteri karena memproduksi senyawa fitoterapi yang memiliki sifat sama dengan yang dihasilkan oleh tanaman tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi daya hambat metabolit dan mengidentifikasi spesies bakteri rizosfer *O. stamineus* yang memiliki potensi paling tinggi terhadap *E. coli* 2056-U. Bakteri rizosfer *O. stamineus* diisolasi dari tanah dengan metode dilusi bertingkat. Skrining awal potensi kultur isolat bakteri dalam menghambat *E. coli* 2056-U diuji dengan metode *disc diffusion*. *Cell-free supernatant* isolat bakteri juga diuji potensi hambatnya terhadap *E. coli* 2056-U. Bakteri yang memiliki kemampuan hambat paling tinggi diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Isolat KK5 dan KK17 memiliki aktivitas antimikroba tertinggi terhadap *E. coli* 2056-U di antara 20 bakteri rizosfer *O. stamineus*, yaitu secara berurutan sebesar  $7,33 \pm 0,81$  mm dan  $7,10 \pm 0,42$  mm. *Cell-free supernatant* isolat KK5 memiliki kemampuan daya hambat tertinggi  $7,28 \pm 0,08$  mm. Isolat KK5 memiliki similaritas tertinggi (100 %) dengan tiga strain bakteri, yaitu *Bacillus cereus* ATCC 14579<sup>T</sup>, *B. cereus* HN002, dan *B. cereus* IAM 12605<sup>T</sup>.

Kata kunci: bakteri rizosfer, daya hambat, *Escherichia coli*, infeksi saluran kemih, *Orthosiphon stamineus*

repository.ub.ac.id

**Potency of Rhizosphere Bacteria Metabolites of Cat's Whiskers Plant (*Orthosiphon stamineus*) as Antibacteria against *Escherichia coli* 2056-U Causing Urinary Tract Infection**

Vania Andona, Suharjono

Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,  
Brawijaya University  
2018

**ABSTRACT**

Cat's whiskers plant (*Orthosiphon stamineus*) is used for treating urinary tract infection which is caused by *Escherichia coli*. Rhizosphere bacteria of *O. stamineus* are able to produce metabolites as an antibacterial because it can produce the similar phytotherapeutic compound properties as produced by its plant. The objectives of this research were to analyze the potency of rhizosphere bacteria of *O. stamineus* metabolites against *E. coli* 2056-U which demonstrate the highest potency. Rhizosphere bacteria of *O. stamineus* was isolated from soil using serial dilution method. Pre-screening of rhizosphere bacteria isolates culture against *E. coli* 2056-U was tested using disc diffusion method. Inhibitory potency of isolate bacteria's cell-free supernatant were tested against *E. coli* 2056-U. Bacteria with the highest potency was identified based on 16S rDNA sequence. Isolate KK5 and KK17 had the highest antimicrobial activity against *E. coli* 2056-U among 20 rhizosphere bacteria of *O. stamineus* that were  $7,33 \pm 0,81$  mm and  $7,10 \pm 0,42$  mm, respectively. Cell-free supernatant of KK5 had the highest inhibiting potency that was  $7,28 \pm 0,08$  mm. Isolate KK5 had 100 % similarity with three strain of bacteria, that was *Bacillus cereus* ATCC 14579<sup>T</sup>, *B. cereus* HN002, and *B. cereus* IAM 12605<sup>T</sup>.

**Keywords:** *Escherichia coli*, inhibitory potency, *Orthosiphon stamineus*, rhizosphere bacteria, urinary tract infection

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Potensi Metabolit Bakteri Rizosfer Tanaman Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*) sebagai Antibakteri *Escherichia coli* 2056-U Penyebab Infeksi Saluran Kemih” dapat diselesaikan. Skripsi ini dibuat sebagai syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, yaitu:

1. Bapak Dr. Suharjono, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah mendampingi dan memberikan pengarahan.
2. Bapak Irfan Mustafa, S.Si, M.Si, Ph.D dan Bapak Yoga Dwi Jatmiko, S.Si, M.App.Sc., Ph.D selaku dosen penguji.
3. Dosen Mikrobiologi dan laboran Laboratorium Mikrobiologi yang membantu selama penelitian berlangsung.
4. Orang tua yang telah memberikan doa dan dukungannya untuk keberhasilan.
5. Seluruh anggota *working group* Mikrobiologi dan Microholic 2014 yang menjadi tempat saling tukar pikiran.
6. Teman-teman Biologi angkatan 2014 yang ikut memberi semangat dan dukungan.

Kekurangan dalam membuat skripsi ini cukup disadari sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan skripsi ini.

Malang, 17 Oktober 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN</b> .....	xiv
 <b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	 1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	2
 <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	 3
2.1 Tanaman Kumis Kucing ( <i>Orthosiphon stamineus</i> ) .....	3
2.2 Mikroorganisme Rizosfer Tanaman Obat .....	4
2.3 Infeksi Saluran Kemih .....	5
2.4 <i>Escherichia coli</i> sebagai Flora Normal dan Patogen .....	6
2.5 <i>Escherichia coli</i> Penyebab Infeksi Saluran Kemih .....	8
2.6 Pengobatan Infeksi Saluran Kemih .....	11
2.7 Mekanisme Resistensi <i>Escherichia coli</i> terhadap Antibiotik .....	13
2.8 Metabolit Mikroorganisme .....	14
 <b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	 17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	17
3.2 Pengukuran Faktor Fisika-Kimia Tanah .....	17
3.3 Isolasi Bakteri dari Tanah Rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> .....	18
3.4 <i>Screening</i> Daya Hambat Bakteri Rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	

3.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Rizosfer .....	19
3.6 Uji Potensi Hambat <i>Cell-Free Supernatant</i> Bakteri Rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	20
3.7 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA .....	20
	21
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>24</b>
4.1 Faktor Fisika-Kimia Rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> .....	24
4.2 Potensi Bakteri Rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	26
4.3 Potensi <i>Cell-Free Supernatant</i> Bakteri Rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U ....	27
4.4 Bakteri Rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> sebagai Antibakteri <i>Escherichia coli</i> 2056-U.....	30
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>37</b>
5.1 Kesimpulan .....	37
5.2 Saran .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>45</b>

DAFTAR TABEL

No.		Halaman
1.	Program PCR .....	23
2.	Faktor fisika-kimia tanah rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> .....	24
3.	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (MIC) cerexin A dan B terhadap bakteri patogen .....	33
4.	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (MIC) cerexin C dan D terhadap bakteri patogen dibandingkan dengan cerexin A .....	33



## DAFTAR GAMBAR

No.		Halaman
1.	Struktur kimia asam rosmarinat .....	3
2.	Perubahan <i>E. coli</i> komensal menjadi patogenik ..	7
3.	Mekanisme infeksi bakteri patogen pada saluran kemih .....	10
4.	Mekanisme antibiotik dalam membunuh bakteri	12
5.	Produksi metabolit primer dan sekunder mikroorganisme .....	15
6.	Diameter zona hambat bakteri rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	26
7.	Diameter zona hambat <i>cell-free supernatant</i> bakteri rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U	28
8.	Pohon filogeni isolat KK5 bersama isolat-isolat acuan berdasarkan homologi sekuen 16S rDNA dengan algoritma <i>neighbor-joining</i> .....	31
9.	Perbedaan struktur asam lemak (FA) dan asam amino cerexin A, B, C, dan D .....	32
10.	Struktur kimia thiocillin .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

No.		Halaman
1.	Lokasi pengambilan sampel .....	45
2.	Pembuatan gel agarosa .....	45
3.	Morfologi isolat bakteri rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> .....	46
4.	Bentuk dan Gram bakteri yang diisolasi dari tanah rizosfer <i>Orthosiphon stamineus</i> .....	47
5.	Diameter zona hambat isolat KK5 dan KK17 terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	48
6.	Data uji normalitas diameter zona hambat isolat bakteri rizosfer terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	49
7.	Analisis ANOVA <i>screening</i> potensi hambat bakteri rizosfer terhadap <i>E. coli</i> 2056-U dengan Uji Tukey .....	50
8.	Kurva standar bakteri rizosfer .....	51
9.	Kurva pertumbuhan bakteri KK5 dan KK17 .....	52
10.	Diameter zona hambat <i>cell-free supernatant</i> KK5 dan KK17 berdasarkan waktu inkubasi selama fase stasioner .....	53
11.	Data uji normalitas diameter zona hambat <i>cell-free supernatant</i> KK5 dan KK17 terhadap <i>Escherichia coli</i> 2056-U .....	54
12.	Analisis ANOVA potensi hambat <i>cell-free supernatant</i> bakteri rizosfer terhadap <i>E. coli</i> 2056-U dengan Uji Tukey .....	55
13.	Visualisasi pita 16S rDNA isolat bakteri hasil elektroforesis dengan Gel Doc .....	56
14.	Sekuen contig 16S rDNA KK5 .....	57
15.	Elektroferogram 16S rDNA KK5 <i>forward</i> .....	58
16.	Elektroferogram 16S rDNA KK5 <i>reverse</i> .....	63
17.	<i>Pairwise distance</i> isolat KK5 dengan spesies acuan berdasarkan sekuen 16S rDNA .....	68

## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
DNA	<i>deoxyribose nucleic acid</i>
EtBr	<i>ethidium bromide</i>
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potential hydrogen</i>
sp.	<i>species</i>
TBE	<i>tris borate EDTA</i>
TPC	<i>total plate count</i>
UV	<i>ultraviolet</i>
<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama unit</u>
bp	<i>base pair</i>
C	<i>celcius</i>
δ	<i>delta</i>
g	<i>gram</i>
kb	<i>kilobase</i>
mg	<i>miligram</i>
μL	<i>mikroliter</i>
mL	<i>mililiter</i>
mm	<i>milimeter</i>
nm	<i>nanometer</i>
pmol	<i>pikomol</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) sering digunakan untuk mengobati penyakit infeksi saluran kemih di Indonesia. Bagian tanaman yang umum digunakan sebagai obat adalah daunnya. Salah satu pemanfaatan *O. stamineus* untuk mengobati infeksi saluran kemih disebabkan oleh adanya kandungan bioaktif seperti asam rosmarinat (Siska dkk., 2012; Arifianti dkk., 2014). Senyawa tersebut umumnya dimanfaatkan sebagai antioksidan, antiinflamasi, dan antimikrobia (Ekambaram dkk., 2016). Kasus infeksi saluran kemih di Indonesia pada tahun 2014 ada 90-100 kasus dan jumlah penderita infeksi saluran kemih per tahunnya adalah 100.000 orang (Depkes RI, 2014). Infeksi saluran kemih dapat disebabkan oleh *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Staphylococcus aureus* (Sari dkk., 2015). *Escherichia coli* menjadi bakteri yang paling sering menginfeksi saluran kemih, yaitu sekitar 80 % (Adib, 2012).

Antibiotik merupakan salah satu obat yang umum digunakan oleh penderita infeksi saluran kemih, tetapi penggunaannya yang terlalu sering dapat menyebabkan bakteri patogen menjadi kebal atau resisten terhadap antibiotik tersebut. Mekanisme resistensi antibiotik umumnya dapat disebabkan oleh adanya mutasi, baik mutasi gen maupun mutasi kromosomal pada target obat (Aleksun & Levy, 2007; Fabrega dkk., 2009). Senyawa antibakteri lain yang dapat digunakan untuk melawan *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi saluran kemih dapat diperoleh dari bakteri rizosfer tanaman obat. Menurut Shanthakumar dkk. (2015) tanah memiliki kandungan bakteri yang berpotensi sebagai penghasil antibiotik yang mampu melawan patogen, seperti *E. coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. Koberl dkk. (2013) menjelaskan bahwa mikroorganisme yang berinteraksi dengan tanaman mampu memproduksi senyawa yang memiliki sifat fitoterapi yang sama dengan yang dihasilkan oleh tanamannya.

Antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri merupakan bagian dari metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan oleh bakteri saat

pertumbuhannya berada pada fase stasioner (Renneberg dkk., 2017). Adanya bakteri rizosfer yang berpotensi menghasilkan antibiotik atau antibakteri terhadap *E. coli* menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian dilakukan dengan mengisolasi dan mengevaluasi kemampuan bakteri dari tanah rizosfer kumis kucing (*O. stamineus*) terhadap bakteri *E. coli*. Bagian tanaman *O. stamineus* yang dikenal untuk pengobatan hanya daunnya dan belum ada kajian mengenai pemanfaatan bakteri rizosfer *O. stamineus* untuk antibakteri. Oleh karena itu penelitian ini penting untuk dilakukan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana potensi daya hambat metabolit bakteri rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* terhadap *Escherichia coli* 2056-U?
2. Spesies bakteri rizosfer apakah yang memiliki potensi metabolit paling tinggi sebagai antibakteri *Escherichia coli* 2056-U?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Menganalisis potensi daya hambat metabolit bakteri rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* terhadap *Escherichia coli* 2056-U.
2. Mengidentifikasi spesies bakteri rizosfer yang memiliki potensi metabolit paling tinggi sebagai antibakteri *Escherichia coli* 2056-U.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah dapat memberikan pengobatan lain untuk penyakit infeksi saluran kemih dan menambah pengetahuan terkait kemampuan bakteri rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* sebagai antibakteri *Escherichia coli* 2056-U penyebab infeksi saluran kemih serta menambah pangkalan data keragaman hayati bakteri indigenus Indonesia sebagai penghasil senyawa antibakteri patogen.

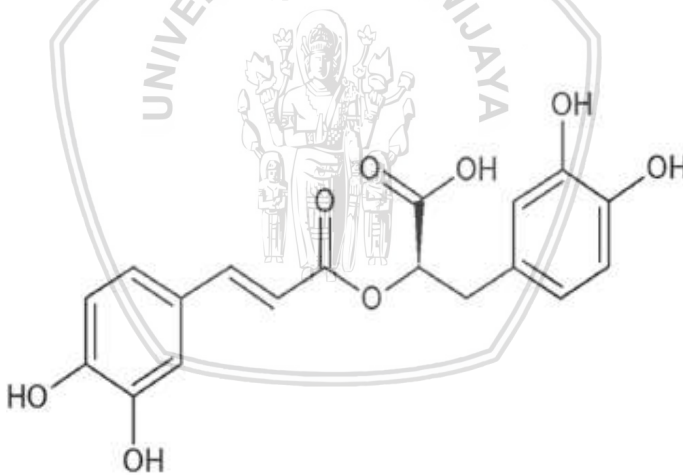


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*)

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) termasuk ke dalam Famili Lamiaceae dan banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Tanaman *O. stamineus* dapat dimanfaatkan sebagai obat infeksi saluran kemih, hipertensi, diabetes, dan lain-lain. *Orthosiphon stamineus* mengandung monoterpen, diterpen, triterpen, saponin, flavonoid, asam organik, dan lain-lain. *Orthosiphon stamineus* dapat bermanfaat sebagai antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan. *Orthosiphon stamineus* dapat berperan sebagai antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen, seperti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enteritidis*, dan *Salmonella typhimurium* (Ekambaram dkk., 2016).



(Ekambaram dkk., 2016)

Gambar 1. Struktur kimia asam rosmarinat

Kemampuan tanaman *O. stamineus* sebagai antibakteri disebabkan oleh adanya kandungan metabolit yang tinggi, yaitu asam rosmarinat (Singh dkk., 2015). Asam rosmarinat termasuk ke dalam kelompok

polifenol. Asam rosmarinat dikenal sebagai antioksidan, antiinflamatori, dan antimikrobal. Asam rosmarinat merupakan dimer dari asam kafeat dan 3,4-*dihydroxyphenyl lactic acid* (Gambar 1). Senyawa fenolik memiliki kemampuan sebagai antimikrobal karena inaktivasi enzim selular yang sangat memengaruhi laju penetrasi senyawa ke dalam sel. Selain itu, daya antimikrobal dapat pula disebabkan oleh kemampuan senyawa fenolik yang mampu mengubah permeabilitas membran (Ekambaram dkk., 2016).

## 2.2 Mikroorganisme Rizosfer Tanaman Obat

Tanaman obat merupakan sumber metabolit sekunder yang sangat kaya. Bakteri menggunakan metabolit untuk meregulasi pertumbuhan dan perkembangannya. Salah satu metabolit sekunder yang dapat diproduksi oleh bakteri adalah antibiotik dan bakteri tanah merupakan sumber utama penghasil antibiotik (Saurabh & Vijay, 2015). Tanaman dan lingkungan tanahnya mengandung beberapa bakteri yang mampu memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik dengan aktivitas spektrum yang spesifik atau luas terhadap beberapa mikroorganisme patogen. Bakteri rizosfer menunjukkan potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *multidrug resistance*, seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Klebsiella pneumoniae* (Shanthakumar dkk., 2015).

Rizosfer merupakan zona antara permukaan akar dengan tanah yang letaknya dekat dengan akar. Bakteri yang hidup di tanah rizosfer dikenal dengan *rhizobacteria*. Bakteri tersebut tinggal di permukaan akar pada tanah dan membentuk *barrier* akar untuk menginfeksi parasit bagi tanaman. Bakteri rizosfer juga mengekskresikan senyawa antibiotik untuk melindungi akar dari parasit dengan memberikan efek racun (Nasrin & Rahman, 2007).

Tanaman dapat menyintesis berbagai senyawa aktif yang kandungannya bermacam-macam bergantung pada spesies tanaman, jenis tanah, dan hubungan tanaman dengan mikroorganisme. Metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman obat dapat memengaruhi mikroorganisme yang memiliki hubungan dengan tanaman tersebut dan fungsi fisiologisnya. Rizosfer tanaman mengandung sumber mikroorganisme yang mampu memengaruhi kesehatan tanaman (Egamberdieva dkk., 2017). Rizosfer dapat

mengandung mikroorganisme hingga  $10^{11}$  sel per gram akar. Masing-masing tanaman obat mengandung mikroorganisme yang spesiesnya bergantung pada metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman. Adanya metabolit tersebut akan memengaruhi hubungan antara mikroorganisme dengan tanaman. Tidak hanya tanaman, tetapi juga mikroorganisme yang berhubungan dengan tanaman mampu memproduksi substansi dengan sifat fitoterapi yang sama dengan yang dihasilkan oleh tanaman. Produk alami, seperti metabolit sekunder, dapat dihasilkan oleh mikroorganisme akibat adanya interaksi antara mikroorganisme dengan inang (tanaman) yang mengandung mikroorganisme tersebut. Dalam hal kesehatan, sifat yang dimiliki oleh tanaman obat dapat menjadi sumber metabolit aktif yang mampu berperan sebagai antibakteri. Tanaman obat dapat berperan sebagai metaorganisme yang mengandung banyak senyawa bioaktif dan mikroorganisme yang berpotensi untuk digunakan sebagai obat (Koberl dkk., 2013). Pertumbuhan, kualitas, dan kesehatan tanaman obat sangat dipengaruhi dan dikontrol oleh mikrobiota tanaman melalui metabolisme mikroorganisme tersebut dan interaksinya dengan inang. Banyaknya bakteri yang terkandung di dalam rizosfer bergantung pada faktor nutrisi mineral seperti nitrogen dan zat besi (Adamovic dkk., 2015).

### 2.3 Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) menyerang saluran kemih bagian atas dan bawah, termasuk kandung kemih dan uretra. Penyakit ini lebih sering menyerang wanita (50-60 %) dibandingkan dengan pria (Heisler & Gebhart, 2008). Infeksi saluran kemih bagian bawah menyerang uretra dan kandung kemih, sedangkan infeksi saluran kemih bagian atas menyerang ginjal. Infeksi tersebut memiliki potensi menyebabkan kematian. Hal tersebut dapat terjadi apabila bakteri bergerak dari ginjal menuju ke peredaran darah yang akan menyebabkan terjadinya sepsis. Sepsis dapat menyebabkan tekanan darah menjadi sangat rendah dan berujung pada kematian (Muhlisin, 2017). Berkembangnya mikroorganisme, seperti bakteri, di dalam saluran kemih menyebabkan terjadinya infeksi saluran kemih karena normalnya saluran kemih tidak mengandung mikroorganisme. Infeksi saluran kemih umumnya (sekitar 80 %) disebabkan oleh *Escherichia*

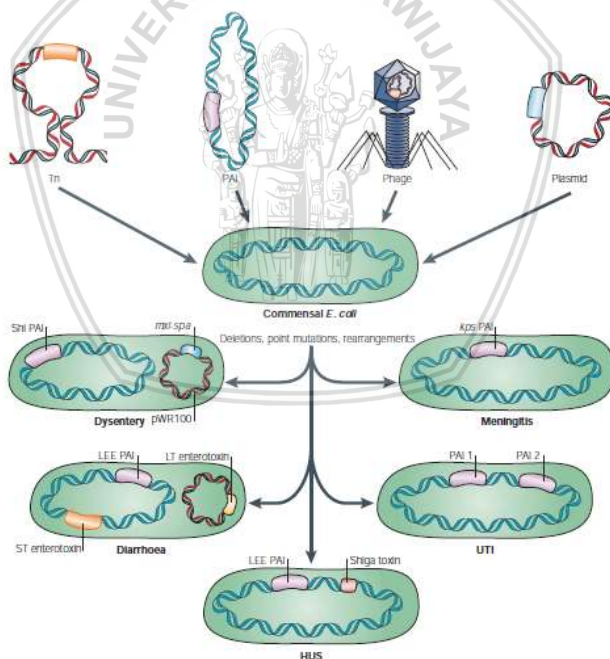
*coli* (Adib, 2012). Penyakit tersebut juga dapat disebabkan oleh bakteri lainnya, seperti *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Staphylococcus aureus* (Sari dkk., 2015). Infeksi saluran kemih dapat terdeteksi apabila terdapat patogen sama dengan atau lebih dari  $10^5$  sel per mililiter sampel urin porsi tengah. Gejala yang dapat terlihat dari penderita infeksi saluran kemih dapat berbeda berdasarkan lokasi terjadinya infeksi saluran kemih, yaitu penderita infeksi saluran kemih bagian atas akan mengalami gejala nyeri pinggang, menggigil, mual, dan muntah, sedangkan penderita infeksi saluran kemih bagian bawah akan mengalami gejala sering buang air kecil dan rasa panas di kandung kemih (Adib, 2012).

## 2.4 *Escherichia coli* sebagai Flora Normal dan Patogen

Usus besar merupakan salah satu tempat bagi bakteri komensal yang disebut dengan mikroflora usus. Bakteri-bakteri tersebut bertahan hidup di dalam saluran gastrointestinal dengan cara mendapatkan nutrisi dari inang. Mayoritas bakteri yang mendiami usus besar adalah *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, dan *Enterobacteria*. Mikroflora memiliki peran untuk mencegah pertumbuhan *strain* patogenik yang dapat menyebabkan penyakit. Tiga fungsi dan efek utama yang dimiliki oleh mikroflora usus pada mukosa adalah fungsi protektif, struktural, dan metabolik. Fungsi protektif mikroflora adalah berkompetisi dengan patogen untuk memperoleh nutrisi di dalam saluran *gastrointestinal*. Fungsi metabolik dari mikroflora adalah menyintesis vitamin-vitamin esensial seperti biotin dan folat serta memfermentasi residu makanan yang tidak dapat dicerna. Saluran gastrointestinal memiliki fungsi protektif untuk mencegah pelekatan *strain* patogenik. Lapisan mukosa mengandung mukus yang dapat memproduksi sakarida yang berperan sebagai sumber energi bagi *strain* komensal dan patogenik (Katouli, 2010).

*Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri yang ditemukan di usus besar manusia dan hewan berdarah panas lainnya. Bakteri tersebut dapat bersifat komensal atau patogenik. Jumlah *E. coli* di dalam usus besar tidak sebanyak bakteri komensal lainnya. *Strain E. coli* patogenik dapat membawa beberapa *virulence factor* yang terlibat

di dalam patogenesis *E. coli*. *Escherichia coli* yang bersifat komensal juga dapat menyebabkan penyakit bagi inang yang memiliki sistem imun rendah atau sistem imun yang tidak mampu merespon infeksi secara normal (Katouli, 2010). *Escherichia coli* yang bersifat patogenik di dalam usus terbagi menjadi beberapa kategori, yaitu *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *enterohaemorrhagic E. coli* (EHEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), *enteroinvasive E. coli* (EIEC), *diffusely adherent E. coli* (DAEC), dan *uropathogenic E. coli* (UPEC). *Uropathogenic E. coli* merupakan strain yang dapat menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih. *Escherichia coli* yang bersifat komensal dapat berubah menjadi patogen akibat pengaruh adanya elemen *mobile genetic*. *Virulence factor* pada *E. coli* dapat dikode oleh beberapa elemen *mobile*, seperti transposon (Tn), *pathogenicity island* (PAI), *phage*, dan plasmid (Gambar 2) (Kaper dkk., 2004).



(Kaper dkk., 2004)

Gambar 2. Perubahan *E. coli* komensal menjadi patogenik

*Pathogenicity island* (PAI) merupakan salah satu elemen yang mengkode *virulence factor* pada *E. coli* penyebab infeksi saluran kemih. *Pathogenicity island* merupakan elemen *mobile genetic* yang tersusun oleh lebih dari 10 kb DNA yang diinsersikan ke dalam gen tRNA. Elemen PAI mengandung *insertion sequence*, integrase dan transposase, serta guanin dan sitosin yang membedakan bakteri tersebut dari genom bakteri inang. Elemen PAI ditemukan banyak pada genom bakteri patogen, khususnya PAI 1 dan PAI 2 ditemukan pada *E. coli* penyebab infeksi saluran kemih (Sabate dkk., 2006).

## 2.5 *Escherichia coli* Penyebab Infeksi Saluran Kemih

*Escherichia coli* merupakan bakteri penyebab infeksi saluran kemih yang paling banyak ditemukan (Sari dkk., 2015). *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang dan bersifat anaerob fakultatif. Mayoritas *strain E. coli* bersifat tidak berbahaya dalam mengolonisasi saluran gastrointestinal pada manusia. Bakteri tersebut bersifat sebagai flora normal, namun beberapa *strain* dapat berevolusi menjadi *E. coli* yang bersifat patogenik (Lim dkk., 2010). Kemampuan *E. coli* dalam menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih disebabkan oleh adanya ekspresi spektrum faktor *virulence E. coli*, yaitu *surface virulence factor* dan *secreted virulence factor*. *Surface virulence factor* pada *E. coli* adalah fimbriae, kapsul, flagela, dan lipopolisakarida. Fimbriae berperan dalam penempelan bakteri *E. coli* di sepanjang saluran kemih, kapsul dapat menjadi pelindung bakteri *E. coli* dari sistem imun yang dimiliki oleh sel inang, flagela berperan dalam pergerakan bakteri dan berperan penting sebagai penyebab infeksi saluran kemih. Infeksi saluran kemih 70-90 % disebabkan oleh *E. coli* yang berflagela, sedangkan lipopolisakarida berperan dalam mengaktifkan respon proinflamatori dan menginduksi produksi sitokin serta *nitric oxide*. Molekul adhesif (adhesin) yang dimiliki oleh *E. coli* dapat berkontribusi dalam *virulence factor* dengan beberapa cara, yaitu memicu persinyalan antara sel inang dan bakteri, memfasilitasi pelepasan produk bakteri ke jaringan inang, dan meningkatkan invasi bakteri (Bien dkk., 2012).

Selain *surface virulence factor*, ada pula *secreted virulence factor* yang mampu menyebabkan *E. coli* dapat menginfeksi saluran kemih.

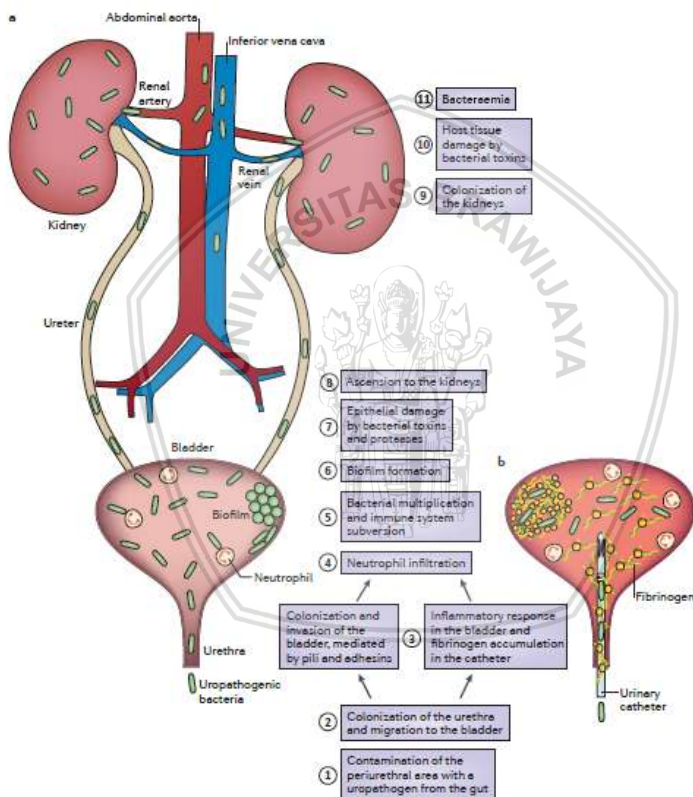


*Virulence factor* tersebut adalah toksin dan lipoprotein. Produksi toksin yang dilakukan oleh *E. coli* dapat menyebabkan respon inflamatori yang dapat menyebabkan munculnya gejala infeksi saluran kemih. Lipoprotein menjadi *virulence factor* terpenting karena lipoprotein yang disebut dengan  $\alpha$ -haemolysin (HlyA) merupakan *pore-forming toxin*. Lipoprotein HlyA termasuk ke dalam famili *repeat in toxin* (RTX) yang banyak dimiliki oleh bakteri patogen Gram negatif. Lipoprotein tersebut dapat memiliki respon yang berbeda-beda dalam konsentrasi yang berbeda pula. Konsentrasi yang tinggi menyebabkan HlyA dapat melisis eritrosit dan sel inang yang memiliki nukleus. Hal tersebut dapat menyebabkan *E. coli* mampu merusak sistem imun efektor dan melewati *mucosal barrier*. Konsentrasi yang rendah menyebabkan HlyA dapat menginduksi apoptosis pada sel inang target, termasuk neutrofil, sel limfosit T, dan sel renal (Bien dkk., 2012).

Pelekatan bakteri pada mukosa saluran kemih merupakan *virulence factor* yang paling utama. Adhesin yang dimiliki oleh bakteri adalah fimbriae. Fimbriae I memediasi pelekatan dengan sel inang melalui pengenalan residu oligosakarida mannosa pada glikoprotein permukaan sel dan memediasi hemaglutinasi eritrosit. Adhesin FimH dari fimbriae tipe I berikatan dengan epitop yang berada di mukosa kandung kemih atau uroplakin pada permukaan sel *uroepithelial*. Fimbriae tipe I memiliki peran yang penting sebagai faktor kolonisasi kandung kemih. Selain fimbriae tipe I, fimbriae tipe P juga memediasi pelekatan melalui penempelan fimbriae pada reseptor oligosakarida, menginduksi aktivasi sel epitel, dan memproduksi IL-6 dan IL-8. Fimbriae tipe S dan F1C dapat berikatan dengan reseptor yang spesifik pada permukaan sel epitel dan endotelial ginjal atau saluran kemih (Manu dkk., 2011).

Infeksi diawali dengan adanya kolonisasi oleh *Escherichia coli* uropatogenik. *Strain* tersebut dikode oleh *pathogenicity islands* (PAI) dan mampu menginfeksi inang yang imunokompeten (Kaper dkk., 2004). Kolonisasi *E. coli* pada *periurethral* kemudian dilanjutkan pula dengan kolonisasi patogen di uretra (Gambar 3). Patogen juga menuju kandung kemih yang menyebabkan adanya interaksi antara patogen dan inang. Kolonisasi patogen di kandung kemih disebabkan oleh adanya adhesin bakteri yang mampu mengenali reseptor di epitel kandung kemih (*uroepithelium*). *Escherichia coli* dapat berikatan

dengan uroplakin (komponen protein utama pada membran apikal *umbrella cell*) dan mampu menghindari sistem imun inang, baik melalui invasi sel inang atau melalui perubahan fisiologis bakteri sehingga menjadi resisten terhadap neutrofil dan dapat bermultiplikasi dan membentuk biofilm. Bakteri patogen mampu bergerak menuju ke ginjal dan mengkolonisasi *renal epithelium* dan memproduksi toksin yang dapat merusak jaringan sel inang (Flores-Mireles dkk., 2015).



(Flores-Mireles dkk., 2015)

Gambar 3. Mekanisme infeksi bakteri patogen pada saluran kemih

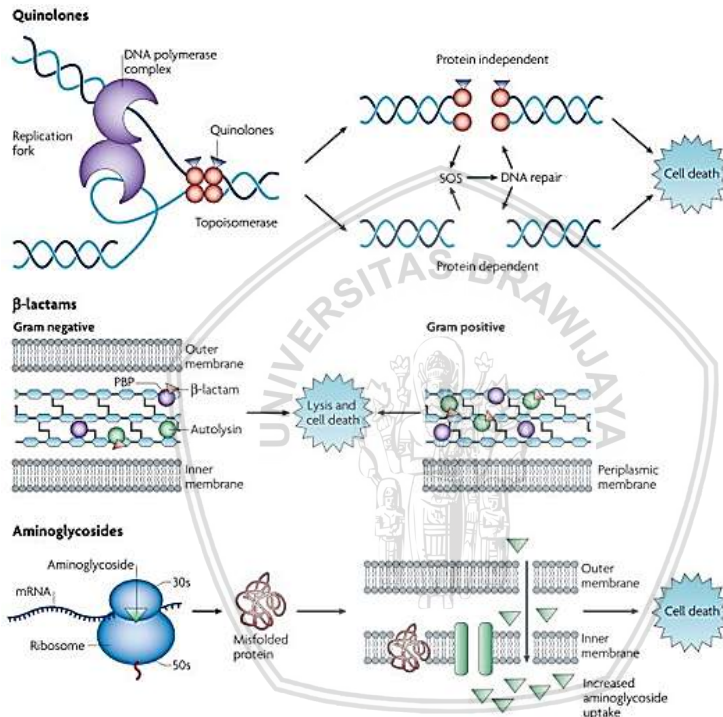


## 2.6 Pengobatan Infeksi Saluran Kemih

Salah satu pengobatan infeksi saluran kemih adalah dengan mengonsumsi antibiotik. Beberapa antibiotik yang dapat dikonsumsi untuk melawan bakteri penyebab infeksi saluran kemih adalah trimethoprim sulfamethoxazole, ciproflaxin, dan ampicilin. Meskipun demikian, bakteri *Escherichia coli* juga telah resisten terhadap antibiotik generasi ketiga cephalosporin. Trimethoprim sulfamethoxazole menjadi antibiotik yang paling sering dikonsumsi untuk mengobati penyakit infeksi saluran kemih. Antibiotik tersebut menjadi efektif dalam membunuh *E. coli* penyebab infeksi saluran kemih karena adanya kombinasi sinergis antara trimethoprim dan sulfamethoxazole yang bekerja dalam dua tahap pada metabolisme folat yang menyebabkan terhambatnya sintesis DNA bakteri tersebut. Ciprofloxacin dan levofloxacin merupakan antibiotik kelompok fluoroquinolone yang dapat menghambat kerja topoisomerase II (DNA gyrase) dan topoisomerase IV. Antibiotik fosfomycin juga digunakan untuk mengobati infeksi saluran kemih. Fosfomycin dapat menghambat pyruvyl transferase atau enzim yang berperan dalam katalisis tahap awal sintesis dinding sel bakteri. Penggunaan antibiotik untuk mengobati infeksi saluran kemih juga perlu diperhatikan karena dapat menyebabkan beberapa efek samping, seperti diare, muntah, dan sakit kepala (Jancel & Dudas, 2002).

Secara umum, antibiotik dapat membunuh bakteri dengan berbagai cara, antara lain menghambat replikasi DNA, menghambat sintesis dinding sel bakteri, dan menghambat sintesis protein. Penghambatan replikasi DNA dapat dilakukan oleh antibiotik quinolone. Quinolone merupakan derivat dari *nalidixic acid* akan mengganggu topologi kromosomal dengan cara menargetkan DNA gyrase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV (topoIV). Enzim topoIV merupakan target primer quinolone pada bakteri Gram positif, sedangkan DNA gyrase merupakan target primer dan topoIV adalah target sekunder pada bakteri Gram negatif, seperti *E. coli*. Kemampuan quinolone membunuh bakteri disebabkan oleh adanya interaksi kompleks yang terbentuk antara antibiotik yang berikatan dengan enzim topoisomerase dan DNA yang telah terpotong (*cleaved DNA*). Interaksi tersebut dapat memengaruhi replikasi DNA bakteri, yaitu replikasi DNA tertahan pada area *replication fork*. Hal tersebut juga memicu penghambatan sintesis DNA dan berdampak kematian sel.

Interaksi antara antibiotik dengan enzim tersebut juga mampu menginduksi respon stress DNA (respon SOS), yaitu RecA diaktivasi oleh kerusakan DNA serta memicu terjadinya *auto cleavage* protein represor LexA, dan menginduksi ekspresi gen respon SOS termasuk enzim DNA repair (Gambar 4) (Kohanski dkk., 2010).



(Kohanski dkk., 2010)

Gambar 4. Mekanisme antibiotik dalam membunuh bakteri

Antibiotik dapat membunuh bakteri dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri. Antibiotik β-lactams dan glikopeptida dapat menghambat biosintesis dinding sel dan berdampak pada perubahan bentuk dan ukuran sel, adanya respon stress sel, dan lisis sel (Gambar 4). Antibiotik β-lactams (termasuk penicillin, carbapenem, dan cephalosporin) menghalangi *cross-linking* unit peptidoglikan (PG)

menghambat reaksi pembentukan ikatan peptida yang dikatalis oleh transpeptidase yang juga dikenal dengan *penicillin-binding proteins* (PBP). Antibiotik  $\beta$ -lactams dapat digunakan untuk membunuh bakteri Gram positif dan negatif, sedangkan glikopeptida hanya efektif melawan bakteri Gram positif. Penghambatan sintesis protein pada bakteri dilakukan oleh dua kelompok antibiotik, yaitu *inhibitor* 50S dan *inhibitor* 30S (Gambar 4). Antibiotik yang merupakan *inhibitor* 50S adalah kelompok macrolide, loncosamide, streptogramin, amphenicol, dan oxazolidinone. *Inhibitor* tersebut menghambat inisiasi translasi protein atau translokasi peptidyl-tRNA. Antibiotik yang termasuk ke dalam *inhibitor* 30S adalah tetracycline dan kelompok antibiotik aminocyclitol yang terdiri dari spectinomycin dan aminoglikosida. Tetracycline menghambat akses aminoacyl-tRNA menuju ke ribosom. Aminoglikosida memiliki sifat bakterisidal yang luas jika dibandingkan dengan *inhibitor* ribosom lainnya. Aminoglikosida yang berikatan dengan ribosom menyebabkan bakteri tidak mampu melakukan translasi. Antibiotik tersebut juga memicu adanya kesalahan dalam translasi protein akibat adanya asam amino yang tidak sesuai di sepanjang untai peptida. Hal tersebut dapat menyebabkan kematian sel. Aminoglikosida mampu membunuh *E. coli* dengan mengubah ultrastruktur membran selnya. Antibakteri tersebut dapat memengaruhi komposisi membran melalui *mistranslated* protein membran (Kohanski dkk., 2010).

## 2.7 Mekanisme Resistensi *Escherichia coli* terhadap Antibiotik

*Escherichia coli* telah mengalami resistensi terhadap beberapa kelompok antibiotik, seperti  $\beta$ -lactams, fluoroquinolone, dan aminoglycoside. Resistensi terhadap  $\beta$ -lactams terjadi karena adanya gen yang terletak di plasmid atau transposons. Resistensi terhadap fluoroquinolone disebabkan oleh adanya mutasi di dalam target obat, DNA gyrase, dan topoisomerase IV. Mutasi tersebut umumnya ditemukan di *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) pada HlyA dan ParC/GrlA. Mutasi lebih banyak terjadi pada beberapa asam amino. Resistensi terhadap aminoglycoside terjadi karena adanya protein yang mengasetilasi nitrogen, memfosforilasi, dan mengadenilasi aminoglikosida. Asetilasi nitrogen dilakukan oleh enzim asetil transferase yang mampu memodifikasi tobramycin,

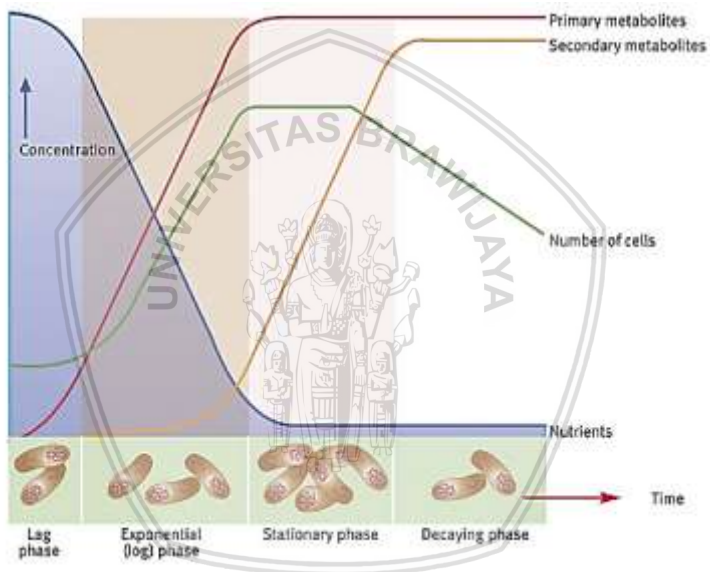
gentamicin, netilmicin, dan amikacin. Fosforilasi dilakukan oleh enzim fosfotransferase yang dapat memengaruhi kerentanan terhadap amikacin. Adenilasi dilakukan oleh enzim nucleotidyltransferase yang mampu mengubah aktivitas tobramycin (Aleksun & Levy, 2007).

Mekanisme resistensi terhadap fluoroquinolone dapat terjadi karena mutasi kromosomal di gen yang mengkode protein target dan adanya gen yang terletak di plasmid dan berhubungan dengan resistensi quinolone. Resistensi *E. coli* terhadap fluoroquinolone akibat mutasi kromosomal umumnya terjadi mutasi pada gen *gyrA*, khususnya pada asam amino Ser-83-Leu dan Asp-87-Asn. Resistensi tersebut juga disebabkan mutasi pada kodon asam amino Ser-80-Arg atau kodon asam amino Glu-84-Val pada gen *parC*. Mutasi titik pada gen *gyrA* dapat menurunkan kerentanan terhadap fluoroquinolone karena adanya penurunan akumulasi quinolone atau adanya plasmid yang memediasi mekanisme resistensi quinolone. Penurunan akumulasi obat dapat dihubungkan dengan penurunan ekspresi porin yang merupakan membran protein luar berupa saluran untuk difusi pasif yang hanya dimiliki oleh bakteri Gram negatif dan upregulasi sel *envelope protein* tertentu yang memiliki sistem *energy-dependent efflux* yang spesifik terhadap obat dan disebut dengan transporter *multidrug*. Overekspresi *efflux pump* juga berperan dalam tingginya tingkat resistensi. *Active efflux transporter* umumnya diklasifikasikan menjadi lima superfamili, yaitu *major facilitator superfamily* (MFS), *ATP-binding cassette* (ABC), *resistance/nodulation/division* (RND), *small multidrug resistance* (SMR), dan *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE). Genus *Enterobacteriaceae* memiliki *efflux pump* AcrAB/TolC yang termasuk ke dalam superfamili RND dan terdiri dari tiga komponen, yaitu gen *acrA* dan *acrB* yang menghasilkan protein AcrA, AcrB yang merupakan protein transpor, dan TolC yang merupakan membran protein luar. Inaktivasi *acrA* dan *acrB* atau *tolC* menyebabkan adanya resistensi terhadap fluoroquinolone dan beberapa antibiotik seperti chloramphenicol,  $\beta$ -lactams, trimethoprim, rifampin, aminoglycoside, dan senyawa toksik (Fabrega dkk., 2009).

## 2.8 Metabolit Mikroorganisme

Metabolit yang diproduksi oleh mikroorganisme dapat terbagi menjadi dua, yaitu metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer

disintesis oleh sel karena sangat dibutuhkan untuk pertumbuhannya. Metabolit primer yang diproduksi oleh mikroorganisme adalah asam amino (lisin, fenilalanin, triptofan, dan glutamat), vitamin B<sub>2</sub> dan B<sub>12</sub>, dan lain-lain. Metabolit primer terakumulasi selama fase eksponensial atau fase log mikroorganisme. Metabolit sekunder diproduksi oleh sel namun tidak dibutuhkan untuk proses pertumbuhan. Contoh metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri adalah antibiotik. Metabolit sekunder terakumulasi selama fase stasioner (Gambar 5) (Renneberg dkk., 2017).



(Renneberg dkk., 2017)

Gambar 5. Produksi metabolit primer dan sekunder mikroorganisme

Produksi metabolit sekunder diawali ketika pertumbuhan sel dibatasi oleh kurangnya satu sumber nutrisi, seperti karbon, nitrogen atau fosfat. Metabolit sekunder dapat berupa turunan dari metabolit primer, yaitu asam amino aromatik, asam amino, asetil Co-A, dan gula. Metabolit sekunder yang merupakan turunan dari asam amino aromatik adalah antibiotik chloramphenicol dan candididin. Metabolit

sekunder yang merupakan turunan dari asam amino adalah kelompok antibiotik  $\beta$ -lactams, meliputi penicillin, cephalosporin, dan cephamycins. Metabolit sekunder turunan asetil Co-A adalah insektisida antiparasit & antibiotik erythromycin. Metabolit sekunder turunan gula adalah streptomycin dan kanamycin. Metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroorganisme umumnya digunakan untuk melawan penyakit yang biasanya hanya diobati menggunakan obat-obatan sintetis. Selain menjadi antibiotik, metabolit sekunder juga dimanfaatkan dalam bidang agrikultur sebagai herbisida dan insektisida (Barrios-Gonzalez dkk., 2003).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada November 2017 - Juni 2018. Tanah rizosfer tiga tanaman *Orthosiphon stamineus* diambil dari Materia Medica Batu dengan koordinat masing-masing adalah S 07°52.025' E 112°31.218'; S 07°52.019' E 112°31.226'; dan S 07°52.016' E 112°31.202'. Tanah dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Pengukuran Faktor Fisika-Kimia Tanah

Tanah diambil dari bagian tanah yang dekat dengan akar tanaman (rizosfer) menggunakan sekop tanah dan disimpan di dalam *ice box* untuk dibawa ke laboratorium. Faktor fisika-kimia tanah yang diukur pada rizosfer *Orthosiphon stamineus* adalah suhu tanah, intensitas cahaya, pH tanah, kelembaban tanah, dan bahan organik tanah. Suhu tanah diukur menggunakan termometer tanah. Intensitas cahaya pada tanah diukur menggunakan lux meter. Derajat keasaman atau pH tanah diukur menggunakan pH meter. Tanah rizosfer sebanyak 10 gram dicampurkan dengan 25 mL akuades kemudian diukur dengan pH meter (Carter & Gregorich, 2007). Untuk mengukur kelembaban tanah, 100 gram tanah di dalam Cawan Petri ditimbang sebagai berat awal. Berat Cawan Petri kosong juga ditimbang. Tanah dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C kemudian berat tanah ditimbang kembali. Berat kering tanah dihitung menggunakan persamaan 1 (DeAngelis, 2007).

$$\text{Berat kering tanah (\%)} = \frac{(W_t - w_t)}{(W_t - w)} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

Wt = berat tanah dan cawan Petri awal (g)

wt = berat tanah dan cawan Petri akhir (g)

w = berat cawan Petri kosong (g)



Berat kering tanah digunakan untuk menghitung kelembaban tanah. Kelembaban tanah dapat dihitung menggunakan persamaan 2. Kelembaban tanah dinyatakan dalam persentase (DeAngelis, 2007).

$$\text{Kelembaban tanah (\%)} = 100 \% - \text{berat kering (\%)} \dots\dots\dots (2)$$

Bahan organik tanah dihitung menggunakan persamaan 3. Tanah kering sebanyak 1 gram dikeringkan di dalam *furnace* hingga suhu 500 °C. Berat tanah setelah dibakar ditimbang (Robertson, 2011).

$$\text{Bahan organik tanah (\%)} = \frac{(a - b)}{a} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

a = berat tanah sebelum dibakar (g)

b = berat tanah setelah dibakar (g)

### 3.3 Isolasi Bakteri dari Tanah Rizosfer *Orthosiphon stamineus*

Bakteri rizosfer diisolasi menurut teknik serial dilusi (pengenceran). Tanah rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 500 mL yang berisi 225 mL larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) kemudian dihomogenasi sebagai suspensi sampel pengenceran  $10^{-1}$ . Suspensi sampel sebanyak 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL garam fisiologis kemudian dihomogenasi. Suspensi sampel dari pengenceran  $10^{-1}$  juga diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan mikropipet dan diinokulasikan ke Cawan Petri yang telah berisi *nutrient agar* (NA) kemudian disebar menggunakan batang gelas Drigalski. Langkah tersebut dilakukan hingga pengenceran  $10^{-6}$ . Seluruh kultur dalam Cawan Petri diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Setelah inkubasi, jumlah koloni bakteri pada pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-6}$  dihitung berdasarkan metode *total plate count* (TPC) dengan persamaan 4. Masing-masing koloni bakteri yang berbeda dimurnikan dengan metode gores di media NA dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Koloni bakteri tunggal digores pada media NA miring dan disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C (Mandale dkk., 2017).



$$\text{TPC (CFU/g)} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Vol. suspensi}} \times \frac{1}{\text{fp}} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

fp = faktor pengenceran

### 3.4 Screening Daya Hambat Bakteri Rizosfer terhadap *Escherichia coli* 2056-U

Penelitian ini dilakukan menurut rancangan acak lengkap dengan pengulangan sebanyak tiga kali pada masing-masing isolat bakteri. Parameter yang diamati adalah daya hambat bakteri terhadap *E. coli* 2056-U. *Escherichia coli* 2056-U diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Kultur cair masing-masing isolat bakteri rizosfer disiapkan dengan cara isolat diinokulasikan ke dalam media *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi di dalam *rotary shaker incubator* pada suhu 30 °C selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm kemudian disetarakan densitas optiknya (OD) menjadi 0,2 (densitas optik terendah). Isolat bakteri rizosfer diuji potensinya dalam menghambat *E. coli* 2056-U. *Escherichia coli* 2056-U diinokulasikan ke dalam 10 mL media NB dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam (Case dkk., 2000). Inokulum *E. coli* 2056-U sebanyak 0,1 mL dengan densitas sel  $10^7$  CFU/mL diinokulasikan ke media NA dengan teknik *spread plate* kemudian disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C selama satu jam (Mojtahedzadeh dkk., 2008; Alam & Imran, 2014). Kultur cair bakteri rizosfer sebanyak 30 µL ditetaskan ke atas kertas cakram dengan diameter 5,5 mm (Su dkk., 2015). Kertas cakram diletakkan pada permukaan media NA dan disimpan kembali di dalam kulkas pada suhu 4 °C selama 30 menit. Kertas cakram yang ditetesi akuades steril berperan sebagai kontrol negatif. Cawan Petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong digital. Diameter zona hambat yang diukur termasuk kertas cakram (Amirkaveei & Behbahani, 2011; Rukayadi dkk., 2013; Sabir dkk., 2014; Opinde dkk., 2016). Data diameter zona hambat dianalisis ragam dengan tingkat kepercayaan 95 % dan uji lanjut beda nyata Tukey.

### 3.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Rizosfer

Kultur bakteri berumur 24 jam disiapkan dengan menginokulasi dua ose isolat bakteri ke dalam 60 mL media NB. Kultur bakteri tersebut digunakan untuk pembuatan kurva standar dan kurva pertumbuhan. Kurva standar dibuat berdasarkan perbandingan media NB dengan kultur bakteri, yaitu 8:0, 7:1, 6:2, 5:3, 4:4, 3:5, 2:6, 1:7, dan 0:8. Jumlah sel masing-masing perbandingan dihitung menggunakan hemositometer dengan persamaan 5. Densitas optik bakteri pada tiap perbandingan juga diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm kemudian dibuat kurva standar antara densitas optik dengan jumlah sel bakteri (Hall dkk., 2013).

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Jumlah sel pada semua kotak}}{\text{Jumlah kotak} \times 4 \times 10^{-6}} \dots\dots\dots (5)$$

Kurva pertumbuhan dibuat berdasarkan data kurva standar. Kultur bakteri rizosfer berumur 24 jam sebanyak 4 mL ditambahkan ke dalam 40 mL media NB kemudian sampel kultur diambil pada jam ke-0 hingga jam ke-24 dengan total 14 kali pengambilan sampel. Densitas optiknya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Densitas sel dapat diperoleh dari persamaan regresi pada kurva standar kemudian dibuat kurva pertumbuhan antara densitas sel dengan waktu pengambilan sampel (Hall dkk., 2013).

### 3.6 Uji Potensi Hambat *Cell-Free Supernatant* Bakteri Rizosfer terhadap *Escherichia coli* 2056-U

Uji potensi ini dilakukan menurut rancangan acak lengkap dengan pengulangan sebanyak tiga kali pada masing-masing *cell-free supernatant* isolat bakteri. Parameter yang diamati adalah daya hambat bakteri terhadap *E. coli* 2056-U. Potensi hambat bakteri rizosfer terhadap bakteri patogen dievaluasi pula dari kemampuan metabolitnya atau *cell-free supernatant*.

Bakteri rizosfer dengan diameter zona hambat yang paling tinggi dikulturkan kembali menggunakan 10 mL media NB di dalam *rotary shaker incubator* pada suhu 30 °C, waktu inkubasi hingga mencapai fase stasioner (jam ke-14, 18, dan 24), dan kecepatan 120 rpm. Kultur

tersebut disentrifugasi pada suhu 4 °C dan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet kemudian nilai pH diukur dengan pH meter. Terdapat dua perlakuan terhadap pH supernatan yang digunakan untuk uji potensi hambat, yaitu pH diatur menjadi netral (7) dan pH tidak diatur. Supernatan disaring menggunakan membran filter *Minisart Syringe Filter Cellulose Acetate* 0,2. Supernatan sebanyak 50 µL diteteskan ke kertas cakram kemudian ditunggu hingga kering. Kertas cakram diletakkan pada permukaan media, yang sebelumnya telah diinokulasi 0,1 mL *E. coli* 2056-U ( $10^7$  CFU/mL) dan disimpan di dalam kulkas pada suhu 4 °C selama satu jam, dan akuades steril berperan sebagai kontrol negatif. Cawan Petri disimpan di dalam kulkas terlebih dahulu selama 30 menit sebelum diinkubasi. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam kemudian diukur diameter zona hambatnya. Diameter zona hambat yang diukur termasuk kertas cakram (Alasil dkk., 2014; Nithya & Aminu, 2015; Sinha, 2016). Data dianalisis dengan uji beda nyata menurut Tukey dengan tingkat kepercayaan 95 %.

### 3.7 Identifikasi Bakteri Berdasarkan Sekuen 16S rDNA

Isolat bakteri terpilih dikulturkan dengan metode gores dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Kromosom DNA bakteri diekstraksi dengan menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Bakteri sebanyak lima ose diinokulasi ke dalam 100 µL ddH<sub>2</sub>O steril kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama satu menit dan supernatan dibuang. Lizosim ditambahkan ke dalam Buffer Gram+ yang diletakkan di tabung propilen 15 mL. Buffer Gram+ sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam pelet kemudian dihomogenkan. Sampel diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit dan tabung dibolak-balik setiap 10 menit. Proteinase K sebanyak 20 µL, yang telah dicampurkan dengan ddH<sub>2</sub>O, ditambahkan ke dalam *microtube* kemudian dihomogenkan. Sampel diinkubasi di dalam *water bath* pada suhu 60 °C selama 10 menit dan tabung dibolak-balik setiap tiga menit.

Sampel ditambahkan dengan 200 µL Buffer GB dan dihomogenkan selama 10 detik kemudian diinkubasi di dalam *water bath* pada suhu 70 °C selama 10 menit. Selama inkubasi, tabung

dibolak-balik setiap tiga menit. *Elution Buffer* dipanaskan pada suhu 70 °C. Etanol absolut sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam sampel dan segera dikocok untuk proses pengikatan DNA. Campuran tersebut dipindahkan ke dalam *GD Column* yang sudah berada di dua mililiter *Collection Tube* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama dua menit dan *GD Column* diletakkan di dalam *Collection Tube* yang baru.

Buffer W1 sebanyak 400 µL ditambahkan ke dalam *GD Column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang tertampung pada *Collection Tube* dibuang dan *GD Column* diletakkan kembali pada *Collection Tube*. *Wash Buffer* yang sudah ditambahkan dengan etanol absolut ditambahkan ke dalam *GD Column* sebanyak 600 µL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. Cairan yang tertampung dibuang kemudian *GD Column* di dalam *Collection Tube* disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 selama tiga menit.

*Microtube* baru disiapkan kemudian *GD Column* diletakkan di dalamnya dan ditambahkan 50 µL Buffer *Elution* yang sudah dipanaskan. Sampel dibiarkan selama tiga menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 30 detik. *Microtube* berisi DNA disimpan di dalam suhu -20 °C untuk digunakan sebagai DNA cetakan saat melakukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Sekuen 16S rDNA diamplifikasi dengan menggunakan primer 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'). Sebanyak 19 µL ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam *tube* PCR kemudian ditambahkan 25 µL PCR *mix* yang mengandung buffer PCR, dNTP, dan Taq polymerase. Masing-masing primer berkonsentrasi 10 pmol/µL ditambahkan ke *tube* PCR sebanyak dua mikroliter. *Template* DNA KK5 dan KK17 sebanyak dua mikroliter ditambahkan ke *tube* PCR sehingga volume akhir dari larutan untuk PCR adalah 50 µL. Sekuen 16S rDNA diamplifikasi dalam mesin PCR menggunakan program PCR pada Tabel 1. Tahap pre denaturasi dan *post* ekstensi dilakukan dalam satu siklus, sedangkan tahap denaturasi, *annealing*, dan ekstensi dilakukan dalam 35 siklus (Setia & Suharjono, 2015; Islam dkk., 2016).

Amplikon 16S rDNA diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5 % dengan voltase 50 V selama 60 menit dan disekuensing

di First Base, Malaysia. Sekuen 16S rDNA dibandingkan dengan sekuen di NCBI menggunakan BLASTN untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan kemiripan sekuen nukleotidanya (Setia & Suharjono, 2015; Islam dkk., 2016).

Tabel 1. Program PCR

Tahap	Suhu (°C)	Waktu
Pre denaturasi	94	5 menit
Denaturasi	94	30 detik
<i>Annealing</i>	55	30 detik
Ekstensi	72	90 menit
Post ekstensi	72	5 menit

(Setia & Suharjono, 2015)

Pohon filogeni dibuat dengan aplikasi MEGA6. Sekuen 16S rDNA KK5 dan isolat acuan disejajarkan menggunakan ClustalW kemudian pohon filogeni dibuat menurut algoritma *neighbor-joining*. *Pairwise distance* isolat KK5 dan isolat-isolat acuan juga dihitung berdasarkan model Tamura-Nei (Yadav dkk., 2009).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Faktor Fisika-Kimia Rizosfer *Orthosiphon stamineus*

Tanah rizosfer *Orthosiphon stamineus* memiliki beberapa faktor fisika-kimia yang dapat memengaruhi pertumbuhan bakteri. Faktor fisika-kimia yang diukur adalah suhu tanah, pH, intensitas cahaya, kelembaban tanah, dan bahan organik tanah (Tabel 2).

Tabel 2. Faktor fisika-kimia tanah rizosfer *Orthosiphon stamineus*

Parameter	Nilai
Suhu tanah (°C)	22,5
pH	6,7
Intensitas cahaya (lux)	2431
Kelembaban tanah (%)	72,8
Bahan organik tanah (%)	5,7

Suhu tanah adalah  $22,5 \pm 0,56$  °C. Bakteri rizosfer yang ditemukan masih mampu tumbuh pada suhu tersebut karena nilainya masih dapat ditoleransi untuk pertumbuhan bakteri. Kisaran suhu tanah yang masih dapat ditoleransi untuk pertumbuhan bakteri adalah 21-38 °C (Broadbent, 2011). Jika suhu tanah lebih dari suhu optimal, pertumbuhannya dapat menurun. Suhu yang rendah juga dapat menurunkan pertumbuhan bakteri hingga sepuluh kali lipat (Barcenas-Moreno dkk., 2009). Suhu yang terlalu rendah memiliki pengaruh pada membran sel bakteri. Membran sel akan kehilangan fluiditasnya dan rusak akibat pembentukan kristal es yang menyebabkan melambatnya reaksi kimia dan difusi di dalam sel. Protein menjadi terlalu kaku untuk melakukan reaksi katalisasi dan kemungkinan terdenaturasi. Suhu yang terlalu panas juga dapat mendenaturasi protein dan asam nukleat (Lumen Learning, 2018).

Nilai pH dari tanah rizosfer adalah  $6,7 \pm 0,21$  dan termasuk mendekati 7 atau netral. Nilai tersebut menunjukkan bahwa bakteri rizosfer bersifat neutrofil karena pH habitatnya masih berada di kisaran 5,5-8 (Harley & Prescott, 2002). Tingkat keasaman dapat

memengaruhi faktor abiotik dan biotik. Faktor abiotik yang dipengaruhi oleh pH antara lain adalah ketersediaan karbon, ketersediaan nutrisi, dan solubilitas logam. Faktor biotik yang dipengaruhi oleh pH adalah biomassa bakteri (Rousk dkk., 2009). Nilai pH yang optimal untuk pertumbuhan bakteri berkisar antara 7-7,5. Jika nilai pH lebih tinggi atau lebih rendah, pertumbuhan bakteri dapat semakin menurun (Fernandez-Calvino dkk., 2011).

Tanah rizosfer *O. stamineus* mendapatkan intensitas cahaya sebesar  $2431 \pm 1737,07$  lux dengan kelembaban yang cukup tinggi, yaitu  $72,8 \pm 1,71$  %. Menurut Stres dkk. (2008) kelembaban yang dapat mengoptimalkan pertumbuhan bakteri aerob adalah 50-70 %. Kelembaban tanah mampu mengubah struktur, diversitas, dan aktivitas bakteri tanah. Tanah harus memiliki kelembaban yang baik supaya dapat menjaga diversitas bakteri. Kelembaban tanah yang berlebihan dapat mengurangi biomassa mikroorganisme. Sebaliknya, kekeringan juga dapat mengganggu homeostasis tanah. Kandungan air yang berlebihan akibat banjir atau hujan deras menjadi ancaman bagi kehidupan bakteri aerob (Borowik & Wyszowska, 2016). Kelembaban yang tinggi akan menurunkan laju dekomposisi bahan organik oleh bakteri akibat rendahnya suplai oksigen, sedangkan kelembaban yang rendah akan menurunkan aktivitas mikroorganisme akibat berkurangnya mobilitas mikroorganisme dan potensial air intraseluler (Stres dkk., 2008).

Kandungan bahan organik tanah *O. stamineus* adalah  $5,7 \pm 2,89$  %. Kandungan bahan organik tanah dikonversi menjadi persentase total karbon dan diperoleh nilai sebesar 3,31 %. Menurut Broadbent (2011) total karbon dalam tanah sebesar 2-4 % tergolong dalam kategori rendah. Persentase bahan organik tanah yang diperoleh tidak terlalu tinggi karena bahan organik sudah diuraikan oleh mikroorganisme tanah. Banyaknya jumlah bakteri di dalam tanah rizosfer dapat membantu mempercepat penguraian bahan organik tanah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Borowik & Wyszowska (2016) yaitu semakin banyak mikroorganisme yang tumbuh di tanah, semakin banyak pula bahan organik tanah yang terdegradasi.

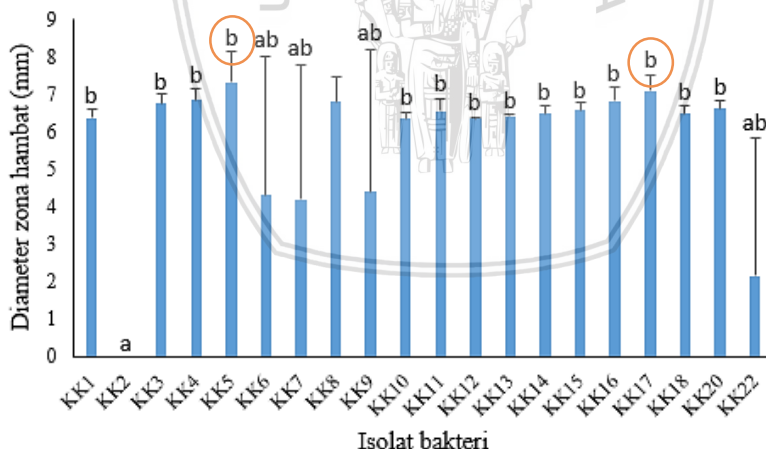
Bahan organik dalam tanah umumnya mengandung unsur karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, fosfor, dan sulfur. Bahan organik tanah merupakan faktor penting untuk menjaga kesuburan tanah. Bahan organik merupakan sumber energi dan makanan bagi organisme tanah.



Mikroorganisme yang ada di dalam tanah dapat menguraikan senyawa-senyawa organik di dalam tanah (Broadbent, 2011).

## 4.2 Potensi Bakteri Rizosfer terhadap *Escherichia coli* 2056-U

Tanah rizosfer *Orthosiphon stamineus* mengandung cukup banyak bakteri, yaitu  $1,69 \times 10^6$  CFU/g. Menurut Geetanjali & Jain (2016) bakteri yang terkandung di dalam tanah rizosfer umumnya memiliki populasi  $10^8$ - $10^9$  CFU/g tanah. Hal tersebut menunjukkan bahwa jumlah bakteri rizosfer yang diperoleh pada penelitian ini lebih sedikit dibandingkan dengan populasi pada umumnya. Jumlah tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor lingkungan yang kurang mendukung pertumbuhan optimal bakteri rizosfer, seperti kelembaban tanah dan total karbon dalam tanah. Tanah *O. stamineus* yang diuji lebih lembab daripada kondisi tanah yang optimal untuk pertumbuhan bakteri sehingga pertumbuhan bakteri dapat terhambat. Kandungan total karbon tanah juga masih dalam kategori rendah sehingga kurang mampu mengoptimalkan pertumbuhan bakteri.



Gambar 6. Diameter zona hambat bakteri rizosfer *Orthosiphon stamineus* terhadap *Escherichia coli* 2056-U



Bakteri rizosfer sebanyak 20 isolat berhasil diisolasi. Mayoritas isolat yang diperoleh berbentuk batang Gram positif, yaitu sebanyak 14 isolat bakteri, sedangkan 6 isolat bakteri lainnya adalah Gram negatif. Masing-masing isolat bakteri yang telah diisolasi diuji potensi daya hambatnya terhadap bakteri patogen, yaitu *Escherichia coli* 2056-U dan diperoleh hasil seperti pada Gambar 6. Terdapat satu isolat yaitu KK2 yang tidak menunjukkan adanya zona hambat atau tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen *E. coli* 2056-U. Diameter zona hambat antarisolat menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Isolat bakteri KK5 dan KK17 memiliki diameter zona hambat tertinggi terhadap *E. coli* 2056-U dan memiliki nilai lebih dari 7 mm, yaitu berturut-turut  $7,33 \pm 0,81$  mm dan  $7,10 \pm 0,42$  mm. Lihan dkk. (2014) melakukan penelitian terkait bakteri tanah di area Hutan Nanga Merit di Sarawak yang mampu memproduksi senyawa antimikroba. Isolat bakteri tersebut diujikan terhadap beberapa bakteri patogen, antara lain *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterobacter aerogenes*. Bakteri tanah yang terisolasi memiliki aktivitas antimikroba yang sangat kuat terhadap *E. coli*, *S. aureus*, dan *E. aerogenes* serta memiliki aktivitas antimikroba yang kuat terhadap *S. typhi*.

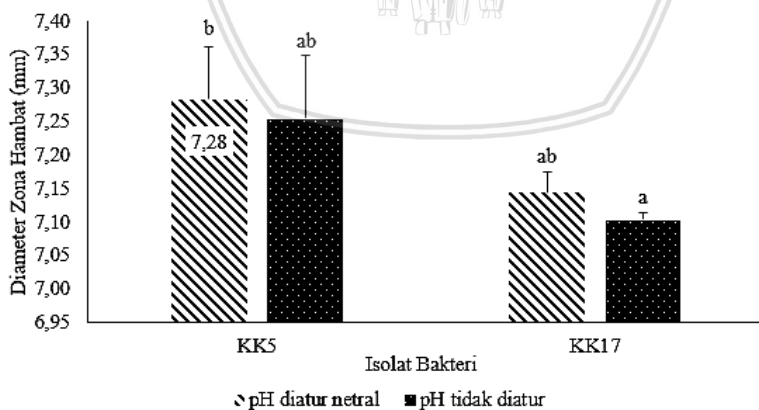
#### **4.3 Potensi Cell-Free Supernatant Bakteri Rizosfer terhadap *Escherichia coli* 2056-U**

Senyawa antibakteri termasuk ke dalam metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan pada fase stasioner bakteri. Untuk mengetahui fase stasioner, dibuat kurva pertumbuhan bakteri KK5 dan KK17. Fase stasioner KK5 dan KK17 dimulai dari jam ke-14 hingga jam ke-24. Isolat KK5 memiliki fase lag hingga jam ke-1, sedangkan isolat KK17 tidak memiliki fase lag atau fase adaptasi. Hal tersebut disebabkan medium pertumbuhan kultur bakteri yang digunakan sama dengan medium yang digunakan dalam pembuatan kurva pertumbuhan sehingga bakteri tidak perlu melakukan adaptasi kembali. Jumlah generasi KK5 dan KK17 secara berurutan adalah 7 generasi dalam waktu 1,92 jam dan 4 generasi selama 3,14 jam.

Sharma dkk. (2014) menyatakan bahwa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang disintesis oleh mikroorganisme.

Sintesis tersebut dilakukan sebagai perlindungan bakteri terhadap mikroorganisme lain yang merugikan. Metabolit sekunder yang dapat diproduksi oleh mikroorganisme, di antaranya antibiotik, agen antikanker, agrokimia (pestisida dan insektisida), dan *biofuel*. Antibakteri dapat terbagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok yang tidak memproduksi residu dan kelompok penghasil residu. Kelompok yang tidak memproduksi residu merupakan antibiotik yang bekerja cepat dalam menghambat bakteri kemudian menghilang dengan cepat pula tanpa meninggalkan residu aktif, contohnya adalah alkohol, klorin, peroksida, dan aldehid. Kelompok penghasil residu terdiri dari beberapa antibiotik, seperti triclosan, triclocarban, dan benzalkonium klorida.

Metabolit sekunder bakteri diperoleh dari *cell-free supernatant* atau metabolit ekstraselular bakteri. Uji potensi ini dibagi menjadi dua, yaitu supernatan yang diatur nilai pH-nya menjadi netral dan supernatan yang tidak diatur nilai pH-nya. Pengaturan pH dilakukan untuk mencegah adanya penghambatan pertumbuhan bakteri patogen yang disebabkan oleh supernatan yang memiliki pH asam atau akibat adanya produksi asam organik. Nilai pH supernatan isolat KK5 pada jam ke-14, 18, dan 24 inkubasi yang tidak diatur berturut-turut adalah 7,03; 7,29; dan 7,45; sedangkan nilai pH supernatan isolat KK17 berturut-turut adalah 8,08; 8,09; dan 8,08.



Gambar 7. Diameter zona hambat *cell-free supernatant* bakteri rizosfer terhadap *Escherichia coli* 2056-U

Diameter zona hambat pada supernatan yang diatur nilai pH-nya dan tidak diatur tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (Gambar 7). Hal tersebut berarti diameter zona hambat tidak terlalu terpengaruh dari nilai pH yang diperoleh. Gambar 7 menunjukkan potensi hambat *cell-free supernatant* isolat KK5 dan KK17 yang diinkubasi selama fase stasioner. Hasil yang ditampilkan adalah potensi hambat tertinggi saat kultur bakteri diinkubasi selama fase stasioner, yaitu isolat KK5 diinkubasi selama 24 jam, sedangkan KK17 selama 14 jam. Isolat bakteri KK5 yang diinkubasi menunjukkan diameter zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan KK17, yaitu  $7,28 \pm 0,08$  mm. Diameter zona hambat KK17 terhadap *E. coli* 2056-U hanya sebesar  $7,14 \pm 0,03$  mm. Terbentuknya zona hambat menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* 2056-U. Menurut Sulistyani dkk. (2015) bakteri rizosfer tanaman jahe (*Zingiber officinale*), eukaliptus (*Melaleuca leucadendra*), laos (*Alpinia galanga*), dan padi (*Oryza sativa*) memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Supernatan bakteri rizosfer tersebut aktif dalam menghambat *E. coli*. Diameter zona hambat yang terbentuk adalah  $6,5 \pm 0,00$  sampai  $9,38 \pm 1,32$  mm. Selain itu, bakteri tersebut juga mampu menghambat *Staphylococcus aureus*, tetapi aktivitasnya tidak aktif terhadap *E. coli*. Menurut Mashoria dkk. (2014) supernatan bakteri yang diisolasi dari sampel tanah Bhopal India juga memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, yaitu ditunjukkan dengan adanya diameter zona hambat sebesar  $17,37 \pm 0,26$  mm.

Metabolit sekunder atau senyawa antibakteri yang diproduksi oleh isolat bakteri tanah rizosfer *Orthosiphon stamineus* dapat memiliki sifat fitoterapi yang sama dengan metabolit sekunder yang diproduksi oleh tanaman tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Koberl dkk. (2013) yang menyatakan bahwa mikroorganisme yang berinteraksi dengan tanaman dapat memproduksi senyawa fitoterapi yang sama dengan inangnya.

Senyawa asam rosmarinat yang diproduksi *O. stamineus* termasuk ke dalam kelompok polifenol. Polifenol merupakan senyawa metabolit yang terbagi menjadi dua struktur yaitu flavonoid dan non flavonoid. Flavonoid terbagi menjadi beberapa subkelas, yaitu flavonol, flavon, flavanon, *anthocyanidin*, dan isoflavon, sedangkan kelompok non flavonoid terdiri dari turunan asam benzoat dan turunan

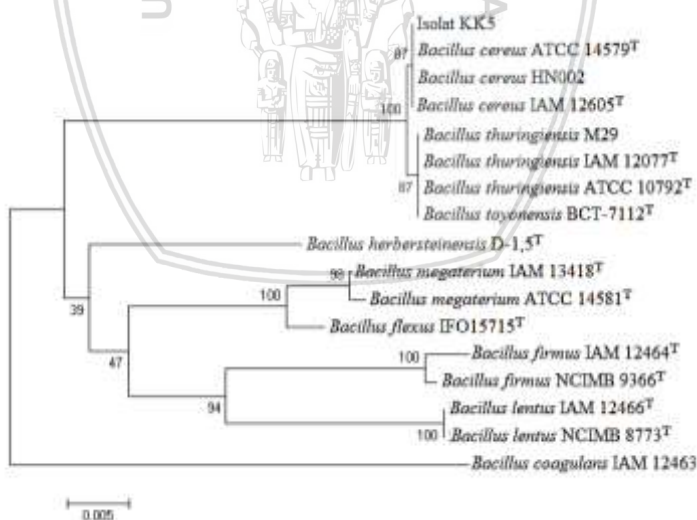
asam sinamat. Kelompok polifenol yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi dan memiliki spektrum luas di antaranya adalah flavan-3-ols, flavonol, dan tannin. Flavan-3-ols mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, dan *Escherichia coli*. Senyawa flavonol memiliki aktivitas penghambatan beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif. Flavonol dapat menembus fosfolipid membran sel sehingga dapat memanfaatkan aktivitas antibakterinya di dalam sel. Senyawa tannin terbagi menjadi subkelas proantosianidin serta gallotannin dan ellagitannin. Proantosianidin dapat menghambat beberapa bakteri patogen, seperti *E. coli* uropatogenik, *S. mutans*, dan *S. aureus*. Senyawa tersebut terbagi menjadi senyawa tipe A dan tipe B. Mekanisme antibiotik senyawa proantosianidin tipe A adalah menyebabkan membran sitoplasmik tidak stabil, permeabilisasi membran sel, menghambat enzim ekstraselular mikroorganisme, dan bekerja langsung pada metabolisme mikroorganisme (Daglia, 2012).

Flavonon menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat pada bakteri Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, dan *Micrococcus luteus*) dan aktivitas antimikroba yang sedang pada bakteri Gram negatif (*E. coli* dan *P. aeruginosa*). Senyawa polifenol non flavonoid adalah asam fenol. Senyawa tersebut mampu menghambat bakteri patogenik sistem pernapasan, seperti *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Moraxella catarrhalis*, dan *Enterococcus faecalis* (Coppo & Marchese, 2014).

Tanaman *O. stamineus* juga mengandung senyawa-senyawa lain, seperti flavonoid, fenilpropanoid (turunan asam kafeat), dan terpenoid (umumnya diterpen dan triterpen). Kelompok flavonoid yang umumnya ditemukan adalah sinensetin; eupatorin; 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavones; tetramethyl-scutellarein; salvegenin; ladanein; vomifoliol; 7,3',4'-tri-*O*-methylluteolin; dan scutellarein tetramethylether. Turunan asam kafeat yang terkandung di antaranya adalah asam kafeat; asam rosmarinat; *chicoric acid*; dan 2,3-dicaffeoyltartaric acid. Kelompok terpenoid yang ditemukan adalah orthosiphols A-Z, staminolactones A-D, orthosiphones A-D, staminolactones A dan B, secoorthosiphols A-C, norstaminols A-C, serta siphonols A-E (Ameer dkk., 2012).

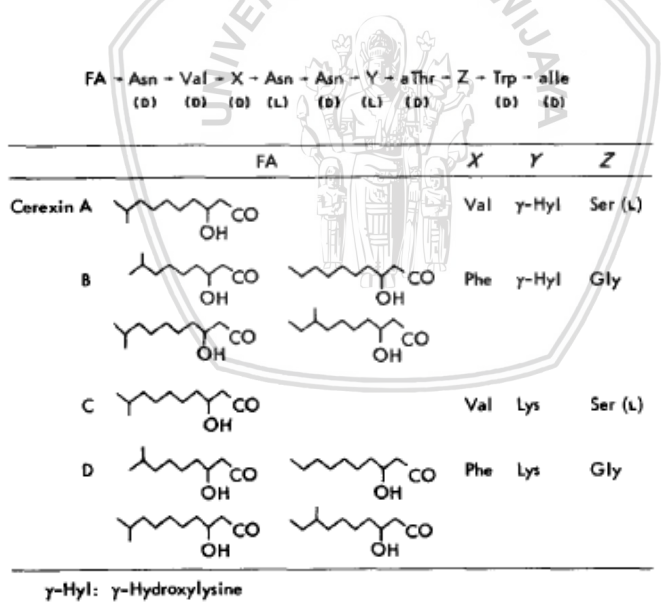
#### 4.4 Bakteri Rizosfer *Orthosiphon stamnieus* sebagai Antibakteri *Escherichia coli* 2056-U

Konsentrasi *template* DNA KK5 dan KK17 yang diukur menggunakan nanodrop adalah 3,07 dan 12,52 ng/ $\mu$ L. Isolat bakteri KK5 dipilih untuk diidentifikasi karena menunjukkan diameter zona hambat tertinggi. Hasil elektroferogram sekuen isolat KK5 menunjukkan kualitas yang baik karena puncak atau *peak* pada masing-masing basa tidak saling bertumpuk. Panjang basa isolat KK5 setelah dilakukan *contig* pada sekuen *forward* dan *reverse* adalah 1470 bp. Panjang basa tersebut layak untuk menganalisis kemiripan sekuen 16S rDNA isolat KK5 dengan sekuen bakteri acuan di *database*. Spesies bakteri yang ditunjukkan dari hasil *BLAST* isolat KK5 menjadi acuan bakteri pembanding untuk pembuatan pohon filogeni. Hasil filogeni menunjukkan bahwa similaritas tertinggi sebesar 100 % dengan *Bacillus cereus* ATCC 14579<sup>T</sup>, HN002, IAM 12605<sup>T</sup> (Gambar 8). Menurut Drancourt dkk. (2000) bakteri yang memiliki kemiripan sekuen 16S rDNA dengan bakteri pada *database* lebih dari 97 % merupakan satu genus dan 99 % untuk tingkat spesies.



Gambar 8. Pohon filogeni isolat KK5 bersama isolat-isolat acuan berdasarkan homologi sekuen 16S rDNA dengan algoritma *neighbor-joining*

*Bacillus cereus* merupakan bakteri aerob yang biasa ditemukan di dalam tanah. Bakteri ini dapat memproduksi antibiotik berupa biocerin, cerexin, dan thiocillin (Katz & Demain, 1977). Biocerin dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif pada konsentrasi 0,5 dan 1 mg/mL. Bakteri yang dapat dihambat pertumbuhannya antara lain adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *B. anthracis*, dan *Sarcina lutea* (Johnson dkk., 1948). Cerexin merupakan lipopeptida linier yang memiliki aktivitas antimikroba yang aktif terhadap *S. aureus* dan *Streptococcus pneumoniae*. Lipopeptida adalah senyawa alami yang diproduksi oleh bakteri dan mengandung rantai *alkyl* panjang yang bersifat hidrofobik dan berikatan dengan polipeptida hidrofilik untuk membentuk struktur linier atau siklik (Zhao & Kuipers, 2016). Cerexin terbagi menjadi empat, yaitu cerexin A, B, C, dan D. Perbedaan dari keempat jenis tersebut adalah komponen asam lemak dan variasi asam amino ketiga, enam, dan delapan (Gambar 9) (Shoji, 1978).



(Shoji, 1978)

Gambar 9. Perbedaan struktur asam lemak (FA) dan asam amino cerexin A, B, C, dan D

Tabel 3. *Minimum inhibitory concentration* (MIC) cerexin A dan B terhadap bakteri patogen

Organisme	MIC (µg/mL)	
	Cerexin A	Cerexin B
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	6,25	6,24
<i>Bacillus anthracis</i>	25	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1	50	50
<i>Diplococcus pneumoniae</i> type I	3,13	6,25
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	6,25	6,25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	>50	>50
<i>Escherichia coli</i>	>50	>50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>50	>50
<i>Salmonella typhimurium</i>	>50	>50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PS-24	>50	>50

(Shoji dkk., 1975)

Tabel 4. *Minimum inhibitory concentration* (MIC) cerexin C dan D terhadap bakteri patogen dibandingkan dengan cerexin A

Organisme	MIC (µg/mL)		
	Cerexin A	Cerexin C	Cerexin D
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	3,13	6,25	6,25
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P JC-1 TOHO	3,13	6,25	12,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> type I	0,78	1,56	3,13
<i>Streptococcus pyogenes</i> C-203	3,13	3,13	6,25
<i>Escherichia coli</i>	>50	>50	>50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>50	>50	>50
<i>Salmonella typhimurium</i>	>50	>50	>50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>50	>50	>50

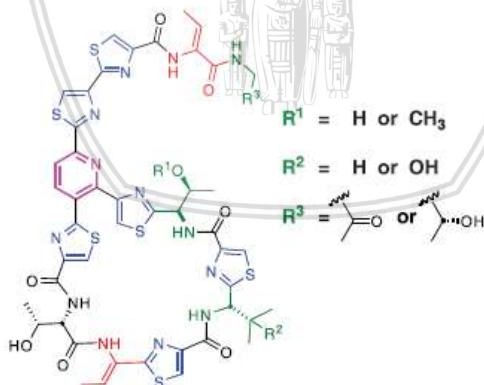
(Shoji dkk., 1976)

Cerexin A dan B aktif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, tetapi tidak aktif menghambat bakteri Gram negatif, fungi, dan



kapang. Spektrum antimikroba cerexin A dan B dapat dilihat pada Tabel 3 (Shoji dkk., 1975). Cerexin A, B, C dan D dapat larut di dalam dimethylsulfoxide, dimethylformamide, tetapi tidak larut di dalam pelarut organik. Aktivitas antimikroba cerexin C dan D jika dibandingkan dengan cerexin A dapat dilihat pada Tabel 4 (Shoji dkk., 1976). Mekanisme cerexin sebagai antibiotik adalah menghambat sintesis dinding sel bakteri. Cerexin dapat menghambat bakteri Gram positif (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, dan *Streptococcus pyogenes*) dan Gram negatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, dan *Moraxella catarrhalis*) (Ray, 2018).

Thiocillin termasuk ke dalam kelompok antibiotik thiazolyl peptide yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein bakteri. Antibiotik tersebut akan berikatan dengan ribosom subunit 50S atau berikatan dengan faktor Tu saat elongasi. Ciri-ciri dari struktur thiocillin adalah memiliki cincin piridin di bagian tengah dengan tiga substituen thiazolyl pada posisi ke-2, 3, dan 6 (Gambar 10). Thiozolyl peptide memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, tetapi tidak untuk bakteri Gram negatif (Walsh dkk., 2010).



(Walsh dkk., 2010)

Gambar 10. Struktur kimia thiocillin



*Bacillus cereus* juga mampu memproduksi cerein yang tergolong ke dalam bacteriocin. Bacteriocin merupakan antimikroba peptida yang disintesis dalam ribosom dan terbagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok I (lanthibiotic) yang mengandung asam amino lanthionine termodifikasi, kelompok II (non-lanthibiotic), dan kelompok III yang terdiri dari bacteriocin dengan berat molekul tinggi (Oscariz dkk., 1999 & 2005). Bacteriocin umumnya menjadikan membran bakteri sebagai targetnya. Bacteriocin bersifat hidrofobik sehingga dapat melakukan interaksi dengan lipid bilayer pada membran sitoplasma (Oscariz & Pisabarro, 2000).

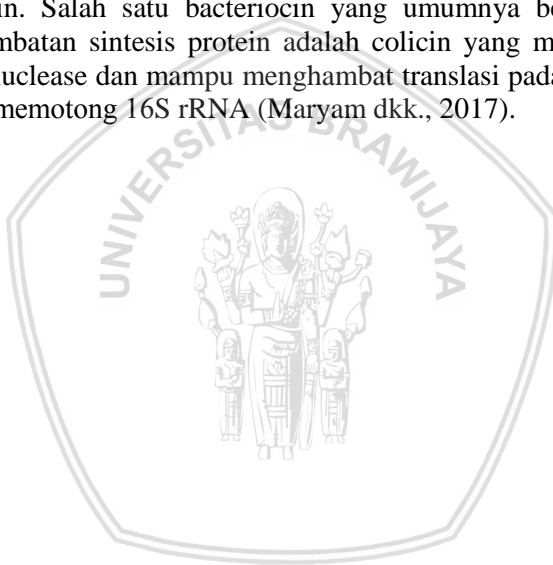
Lanthibiotic merupakan senyawa yang disintesis di dalam ribosom sebagai peptida prekursor. Senyawa tersebut dimodifikasi oleh proses dehidrasi residu serine dan threonine serta adanya penambahan intramolekular pada cysteine yang menghasilkan pembentukan ( $\beta$ -methyl) lanthionine thioether. Beberapa bacteriocin atau *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) termasuk ke dalam kelompok dua (cystibiotic) yang mengandung *pediocin-like bacteriocin* (kelas IIa) dan *two-peptide bacteriocin* (kelas IIb). Cerein termasuk ke dalam kelas II yang terdiri dari senyawa berukuran kecil (0,77-10 kDa), mengandung peptida linier dan tidak dimodifikasi (Abriouel dkk., 2010).

Cerein memiliki sifat yang stabil terhadap panas dan aktivitas antibiotiknya dapat bertahan pada perlakuan suhu 100 °C selama 15 menit. Senyawa ini juga stabil pada rentang pH yang luas dan tidak mudah terdenaturasi oleh pelarut organik (Oscariz & Pisabarro, 2000). Aktivitas spektrum cerein diuji terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Hasil menunjukkan bahwa cerein aktif dalam membunuh bakteri Gram positif, tetapi tidak aktif terhadap bakteri Gram negatif. Meskipun cerein tidak dapat membunuh bakteri Gram negatif, senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut (Oscariz dkk., 1999; Bizani dkk., 2005).

Cerein mulai mampu membunuh bakteri target, yaitu *Listeria innocua* dalam waktu lima menit setelah diberi perlakuan, tetapi pengaruh tersebut bergantung pada konsentrasi antibiotik yang digunakan. Cerein juga dapat memicu sel lisis dan hal ini dikarenakan oleh adanya pelepasan enzim autolitik yang biasanya berikatan secara elektrostatik dengan polimer anionik (asam teikoat dan lipoteikoat)

pada dinding sel. Enzim tersebut digantikan oleh bacteriocin yang bersifat kationik (Oscariz & Pisabarro, 2000).

Mekanisme bacteriocin dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme target adalah menghambat sintesis dinding sel, menghambat fungsi membran sel, mengganggu sintesis protein, menghambat transkripsi dan replikasi DNA, menghambat sintesis folate, dan membentuk septum. Bacteriocin menghambat sintesis dinding sel dengan cara memotong lipid II pada membran yang merupakan prekursor pada sintesis dinding sel atau dengan cara membentuk pori di membran sehingga sel dapat mati. Bacteriocin dapat menghambat sintesis protein dengan cara mengganggu proses translasi protein. Salah satu bacteriocin yang umumnya berperan dalam penghambatan sintesis protein adalah colicin yang memiliki aktivitas endonuclease dan mampu menghambat translasi pada ujung 3' sekuen dan memotong 16S rRNA (Maryam dkk., 2017).



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Metabolit sekunder isolat KK5 dari rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* memiliki potensi paling tinggi dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* 2056-U.
2. Isolat KK5 dari rizosfer tanaman *Orthosiphon stamineus* berdasarkan sekuen 16S rDNA teridentifikasi sebagai *Bacillus cereus* ATCC 14579<sup>T</sup>, HN002, dan IAM 12605<sup>T</sup> dengan similaritas 100 %.

#### 5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan mengenai penelitian ini adalah:

1. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan uji daya hambat menggunakan metabolit bakteri rizosfer berupa hasil *freeze drying* sehingga dapat diketahui konsentrasi hambat minimum masing-masing bakteri rizosfer terhadap patogen. Selain itu, perlu juga dilakukan uji lebih lanjut bakteri rizosfer terhadap beberapa bakteri menguntungkan di saluran kemih supaya kemampuan hambat bakteri rizosfer tidak merugikan bagi bakteri lain. Metabolit yang dihasilkan oleh bakteri rizosfer tersebut juga perlu diidentifikasi senyawanya.
2. Untuk industri, perlu dikembangkan potensi metabolit bakteri rizosfer *Orthosiphon stamineus* sebagai antibakteri dan didistribusikan misalnya dalam bentuk obat.
3. Untuk pemerintah, perlu memberikan dukungan fasilitas dan dana bagi riset dan pengembangan serta pemasaran produk.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abriouel, H., C. M. A. P. Franz, N. B. Omar & A. Galvez. 2010. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:201-232.
- Adamovic, D., I. Dalovic & N. Mrkovacki. 2015. Microbial abundance in rhizosphere of medicinal and aromatic plant species in conventional and organic growing systems. *Ratar. Povrt.* 52(1):1-8.
- Adib, M. 2012. Infeksi tersering pada penderita infeksi saluran kencing di Laboratorium Klinika Surabaya. *Jurnal Healthy Science.* 1-10.
- Alam, M. & M. Imran. 2014. Multiple antibiotic resistances in metal tolerant *E. coli* from hospital waste water. *Bioinformation.* 10(5):267-272.
- Alasil, S. M., R. Omar, S. Ismail & M. Y. Yusof. 2014. Antibiofilm activity, compound characterization, and acute toxicity of extract from a novel bacterial species of *Paenibacillus*. *Int. J. Microbiol.* 2014:1-11.
- Alekshun, M. N. & S. B. Levy. 2007. Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128:1037-1050.
- Ameer, O. Z., I. M. Salman, M. Z. Asmawi, Z. O. Ibraheem & M. F. Yam. 2012. *Orthosiphon stamineus*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology: A review. *J. Med. Food.* 15(8):1-13.
- Amirkaveei, S. & B. A. Behbahani. 2011. Antimicrobial effect of mangrove extract on *Eschericia coli* and *Penicillium digitatum*. *IPCBEE.* 9:185-188.
- Arifianti, L., R. D. Oktarina & I. Kusumawati. 2014. Pengaruh jenis pelarut pengekstraksi terhadap kadar sinensetin dalam ekstrak daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada.* 2(1):1-4.
- Barcenas-Moreno, G., M. Gomez-Brandon, J. Rousk & E. Baath. 2009. Adaptation of soil microbial communities to temperature: Comparison of fungi and bacteria in a laboratory experiment. *Glob. Change Biol.* 15:2950-2957.

- Barrios-Gonzalez, J., F. J. Fernandez & A. Tomasini. 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J. Biotechnol.* 2:322-333.
- Bien, J., O. Sokolova & P. Bozko. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int. J. Nephrol.* 2012:1-15.
- Bizani, D., A. S. Motta, J. A. C. Morrissy, R. M. S. Terra, A. A. Souto & A. Brandelli. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *Int. Microbiol.* 8:125-131.
- Borowik, A. & J. Wyszowska. 2016. Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant Soil Environ.* 62(6):250-255.
- Broadbent, F. E. 2011. Soil organic matter. <http://www.boprc.govt.nz>. Diakses tanggal 26 Juni 2018.
- Carter, M. R. & E. G. Gregorich. 2007. **Soil sampling and methods of analysis**. Second Edition. CRC Press. Boca Raton.
- Case, J. F., P. J. Herring, B. H. Robison, S. H. D. Haddock, L. J. Kricka & P. E. Stanley. 2000. **Proceedings of the 11th international symposium on bioilluminescence & chemiluminescence**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. London.
- Coppo, E. & A. Marchese. 2014. Antibacterial activity of polyphenols. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15:380-390.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:174-181.
- Depkes RI. 2014. Waspada infeksi saluran kemih. <http://depkes.go.id>. Diakses tanggal 12 Mei 2017.
- DeAngelis, K. M. 2007. Measurement of soil moisture content by gravimetric method. <http://nature.berkeley.edu>. Diakses tanggal 15 Agustus 2018.
- Drancourt, M., C. Bollet & D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38(10):3623-3630.
- Egamberdieva, D., S. Wirth, U. Behrendt, P. Ahmad & G. Berg. 2017. Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Front. Microbiol.* 8:1-11.

- Ekambaram, S. P., S. S. Perumal, A. Balakrishnan, N. Marappan, S. S. Gajendran & V. Viswanathan. 2016. Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 5(4):358-363.
- Fabrega, A., S. Madurga, E. Giralt & J. Vila. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* 2(1):40-61.
- Fernandez-Calvino, D., J. Rousk, P. C. Brookes & E. Baath. 2011. Bacterial pH-optima for growth track soil pH, but are higher than expected at low pH. *Soil Biol. Biochem.* 43:1569-1575.
- Flores-Mireles, A. L., J. N. Walker, M. Caparon & S. J. Hultgren. 2015. Urinary tract infection: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:1-16.
- Geetanjali & P. Jain. 2016. Antibiotic production by rhizospheric soil microflora – A review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7(11):4304-4314.
- Hall, B. G., H. Acar, A. Nandipati & M. Barlow. 2013. Growth rates made easy. *Mol. Biol. Evol.* 31(1):232-238.
- Harley, J. P. & L. M. Prescott. 2002. **Laboratory exercises in microbiology**. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies. New York.
- Heisler, C. A. & J. B. Gebhart. 2008. Urinary tranct infection in the adult female: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *J. Pelvic Med. Surg.* 14(1):1-14.
- Islam, S., A. M. Akanda, A. Prova, M. T. Islam & M. M. Hossain. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Front. Microbiol.* 6:1360.
- Jancel, T. & V. Dudas. 2002. Management of uncomplicated urinary tract infections. *West J. Med.* 176:51-55.
- Johnson, C. W., H. D. West, H. L. Jones & C. J. Long. 1948. Biocerin: An antibiotic produced by *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 57(1):63-65.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro & H. L. T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2:123-140.

- Katouli, M. 2010. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J. Microbiol.* 2(2):59-72.
- Katz, E. & A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41(2):449-474.
- Koberl, M., R. Schmidt, E. M. Ramadan, R. Bauer & G. Berg. 2013. The microbiome of medicinal plants: Diversity and importance for plant growth, quality, and health. *Front. Microbiol.* 4:1-9.
- Kohanski, M. A., D. J. Dwyer & J. J. Collins. 2010. How antibiotics kill bacteria: From target to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(6):423-435.
- Lihan, S., C. S. Lin, I. Ahmad, F. M. Sinang, N. K. Hua & A. A. Sallehin. 2014. Antimicrobial producing microbes isolated from soil samples collected from Nanga Merit Forest in Sarawak, Malaysian Borneo. *Euro. J. Exp. Bio.* 4(1):494-501.
- Lim, J. Y., J. W. Yoon & C. J. Hovde. 2010. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1):5-14.
- Lumen Learning. 2018. Temperature and microbial growth. <http://courses.lumenlearning.com>. Diakses pada tanggal 14 Agustus 2018.
- Mandale, S. D., V. Dagar & V. Dagar. 2017. Antimicrobial activity of rhizospheric bacteria of *Curcuma longa* (Turmeric) producing metabolites against human pathogens. *IOSR-JPBS.* 12(1):37-42.
- Manu, D., I. Lupan & O. Popescu. 2011. Mechanism of pathogenesis and antibiotics resistance in *Escherichia coli*. *Annals of RSCB.* 16(2):7-19.
- Maryam, H., S. Maqsood & U. Farooq. 2017. Bacteriocins: A novel weapon against emerging resistance. *J. Pathol. Microbiol.* 2(7):220-227.
- Mashoria, A., H. S. Lovewanshi & B. S. Rajawat. 2014. Isolation of antimicrobial producing bacteria from soil samples collected from Bhopal region of Madhya Pradesh, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3(12):563-569.
- Mojtahedzadeh, M., Y. Panahi, M. R. Fazeli, A. Najafi, M. Pazouki, B. M. Navehsi, A. Bazzaz, M. M. Naghizadeh & F. Beiraghdar.



2008. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in patients admitted with sepsis: Etiology, risk factors, and patterns of antimicrobial resistance. *Int. J. Infect. Dis.* 12:312-318.
- Muhlisin, A. 2017. Infeksi saluran kemih – Penyebab, gejala, dan pengobatan. <http://www.mediskus.com>. Diakses tanggal 18 Juni 2017.
- Nasrin, S. & M. A. Rahman. 2007. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria and their effect on germination of rice seeds and growth of seedlings. *J. Bio-sci.* 15:77-82.
- Nithya, T. G. & I. M. Aminu. 2015. Antibacterial activity of *Murraya koenigi* leaves against urinary tract infection causative pathogens. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 8(8):112-117.
- Opinde, H. R., G. W. Gatheri & A. K. Nyamache. 2016. Antimicrobial evaluation of crude methanolic leaf extracts from selected medicinal plants against *Escherichia coli*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 7:272.
- Oscariz, J. C., I. Lasa & A. G. Pisabarro. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:337-341.
- Oscariz, J. C., L. Cintas, H. Holo, I. Lasa, I. F. Nes & A. G. Pisabarro. 2005. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:108-115.
- Oscariz, J. C. & A. G. Pisabarro. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *J. Appl. Microbiol.* 89:361-369.
- Ray, A. 2018. Cerexin. <http://www.sdrugs.com>. Diakses tanggal 24 September 2018.
- Renneberg, V., V. Berkling & V. Loroeh. 2017. **Biotechnology for beginners**. Second Edition. Elsevier, Inc. London.
- Robertson, S. 2011. Direct estimation of organic matter by loss on ignition: Methods. <http://www.sfu.ca>. Diakses pada tanggal 15 Agustus 2018.
- Rousk, J., P. C. Brookes & E. Baath. 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy

- in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(6):1589-1596.
- Rukayadi, Y., K. Y. Lau, N. S. Zainin, M. Zakaria & F. Abas. 2013. Screening antimicrobial activity of tropical edible medicinal plant extraxts against five standard microorgnisms for natural food preservative. *Int. Food Res. J.* 20(5):2905-2910.
- Sabate, M., E. Moreno, T. Perez, A. Andreu & G. Prats. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:880-886.
- Sabir, S., A. A. Anjum, T. Ijaz, M. A. Ali, M. R. Khan & M. Nawaz. 2014. Isolation and antibiotic susceptibility of *E. coli* from urinary tract infections in a tertiary care hospital. *Pak. J. Med. Sci.* 30(2):389-392.
- Sari, P. A., Erly & D. Arisanty. 2015. Perbandingan efektivitas daya hambat kotrimoksazol generik dan paten terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* sebagai penyebab infeksi saluran kemih secara in vitro. *JKA.* 3(1):227-232.
- Saurabh, M. & N. Vijay. 2015. Antimicrobial activity of rhizospheric bacteria of *Azadirachta indica* producing metabolites against human bacterial pathogens. *Int. J. of Life Sci.* A3:21-25.
- Setia, I. M. & Suharjono. 2015. Chitinolytic assay and identification of bacteria isolated from shrimp waste based on 16S rDNA sequences. *Adv. Microbiol.* 5:541-548.
- Shanthakumar, S. P., P. Duraisamy, G. Vishwanath, B. C. Selvanesan, V. Ramaraj & B. V. David. 2015. Broad spectrum antimicrobial compounds from the bacterium *Exiguobacterium mexicanum* MSSRFS9. *Microbiol. Res.* 178:59-65.
- Sharma, A., N. Kumari & E. Menghani. 2014. Bioactive secondary metabolites: An overview. *J. Sci. Eng. Res.* 5(4):1395-1407.
- Shoji, J., H. Hinoo, Y. Wakisaka, K. Koizumi, M. Mayama, S. Matsuura & K. Matsumoto. 1975. Isolation of two new related peptide antibiotics, cerexins A and B (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*, I). *J. Antibiot.* 28(1):56-59.
- Shoji, J., T. Kato, K. Matsumoto, Y. Takahashi & M. Mayama. 1976. Production and isolation of cerexins C and D (Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XVIII). *J. Antibiot.* 29(12):1281-1285.

- Shoji, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from the Genus *Bacillus*. *Adv. Appl. Microbiol.* 24:187- 207.
- Singh, M. K., B. Gidwani, A. Gupta, H. Dhongade, C. D. Kaur, P. P. Kashyap & D. K. Tripathi. 2015. A review of the medicinal plants of genus *Orthosiphon* (Lamiaceae). *Int. J. Biol. Chem.* 9(6):318-331.
- Sinha, N. 2016. Antibacterial activity of *Andrographis paniculata* Nees against selective human pathogens. *IJRASET.* 4(6):274-278.
- Siska, H. Sunaryo & Jamaliah. 2012. Pemanfaatan daun kumis kucing (*Orthosiphon spicatus* B.B.S) sebagai antiglaukoma. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 17(1):16-20.
- Stres, B., T. Danevcic, L. Pal, M. M. Fuka, L. Resman, S. Leskovec, J. Hacin, D. Stopar, I. Mahne & I. Mandic-Mulec. 2008. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:110-122.
- Sulistiyani, N., Y. B. Murti, J. Widada & Mustofa. 2015. Biodiversity of antibiotic-producing soil bacteria from Yogyakarta Special Province Indonesia. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8(2):122-126.
- Su, P., C. Yang, J. Yang, P. Su & L. Chuang. 2015. Antibacterial activities and antibacterial mechanism of *Polygonum cuspidatum* extracts against nosocomial drug-resistant pathogens. *Molecules.* 20:11119-11130.
- Walsh, C. T., M. G. Acker & A. A. Bowers. 2010. Thiazolyl peptide antibiotic biosynthesis: A cascade of post-translational modifications on ribosomal nascent proteins. *J. Biol. Chem.* 285(36):27525-27531.
- Yadav, V., S. Prakash, S. Srivastava, P. C. Verma, V. Gupta, V. Basu & A. K. Rawat. 2009. Identification of *Comamonas* species using 16S rRNA gene sequence. *Bioinformation.* 3(9):381-383.
- Zhao, X. & O. P. Kuipers. 2016. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of *Bacillales* species. *BMC Genomics.* 17:882.